



Institutional Repository - Research Portal Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de l'effet de l'expression ectopique de **MAGEE1** sur la prolifération et la survie cellulaire

André, Thibaud

Award date:
2007

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 23. Jun. 2020

Table des matières

<u>INTRODUCTION</u>	4
I. <u>LES GENES <i>MAGE</i></u>	4
I.1. <u>La découverte des gènes <i>MAGE</i></u>	4
I.1.1. <u>Définition moléculaire de l'antigène MZ2-E</u>	4
I.2. <u>Classification des gènes <i>MAGE</i></u>	5
I.2.1. <u>Les gènes <i>MAGE</i> de type I</u>	7
I.2.1.1. <u>Les gènes <i>MAGEA</i></u>	8
I.2.1.1.1. <u>Le gène <i>MAGEA1</i></u>	8
I.2.1.1.2. <u>Le gène <i>MAGEA4</i></u>	10
I.2.2. <u>Les gènes <i>MAGE</i> de type II</u>	11
I.2.2.1. <u>Necdin</u>	12
I.2.2.2. <u>Le gène <i>MAGED1</i></u>	13
I.2.2.3. <u>Le gène <i>MAGED2</i></u>	16
I.2.2.4. <u>Le gène <i>MAGEE1</i></u>	16
II. <u>DYSTROPHINE ET DYSTROBREVINE*</u>	17
II.1. <u>La dystrophine</u>	17
II.2. <u>Le complexe de la dystrophine</u>	18
II.2.1. <u>La dystrobrevine</u>	19
II.2.2. <u>Dystroglycane et cancers</u>	21
<u>OBJECTIFS DU MEMOIRE</u>	23
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	25
I. <u>MATERIEL</u>	25
I.1. <u>Solutions</u>	25
I.2. <u>Plasmides</u>	25
I.3. <u>Oligonucléotides</u>	27

<u>I.3.1. Séquençage de <i>MAGEE1</i></u>	27
<u>I.3.2. Synthèse de <i>MAGEE1a</i></u>	27
<u>I.2.3. Mutagenèse de pcDNA 3.1 HisC-E1</u>	28
II. <u>MÉTHODES</u>	28
II.1. <u>TECHNIQUES RELATIVES A L'UTILISATION D'ADN</u>	28
<u>II. 1.1 Transformation d'Escherichia coli par choc électrique</u>	28
<u>II.1.2. Culture bactérienne</u>	28
<u>II.1.3. Préparation d'ADN plasmidique par lyse alcaline</u>	28
<u>II.1.4. Electrophorèse en gel d'agarose</u>	29
<u>II.1.4.1. Les échantillons</u>	29
<u>II.1.4.2. Marqueur de Poids Moléculaire pour ADN</u>	29
<u>II. 1.4.3. Préparation du gel</u>	29
<u>II.1.5. Restrictions sur plasmide</u>	29
<u>II.1.6. Ligation d'un plasmide</u>	30
<u>II.1.7. Purification de l'ADN sur colonne</u>	30
<u>II.1.7.1. Purification d'ADN à partir du gel d'agarose</u>	30
<u>II.1.7.2. Purification de l'ADN</u>	30
<u>II.1.8. PCR (Polymerase Chain Reaction)</u>	31
<u>II.1.9. Transcription/traduction in vitro</u>	32
<u>II.1.9.1. Protocol pour la réaction de transcription/traduction</u>	32
<u>II.1.9.2. Analyse de la réaction par électrophorèse dénaturante</u>	32
<u>II.1.10. TA cloning</u>	33
<u>II.1.10.1. Ligation</u>	33
<u>II.1.10.2. Electroporation et étalement de la ligation</u>	33
<u>II.1.11. Déphosphorylation d'ADN par la « shrimp alcalin phosphatase »</u>	33
II.2. <u>Techniques relatives à l'utilisation de cellules eucaryotiques</u>	34
<u>II.2.1. Transfection cellulaire au moyen de l' « ExGen 500 »</u>	34

II.2.2. <u>Western blot sur lysat</u>	34
II.2.2.1. <u>Lyse des cellules</u>	34
II.2.2.1. <u>Western blot</u>	34
<u>RESULTATS</u>	36
I. <u>CONSTRUCTION DU PLASMIDE PERMETTANT L'EXPRESSION DE <i>MAGEE1</i></u> <u>« ETIQUETE » AVEC L'EPITOPE XPRESS</u>	36
A) <u>Production de <i>MAGEE1a</i> par PCR</u>	40
B) <u>Insertion de <i>MAGEE1a</i> dans pCRII</u>	40
C) <u>Insertion de <i>MAGEE1a</i> dans pcDNA 3.1 HisC</u>	41
D) <u>Insertion de <i>MAGEE1b</i> dans pcDNA 3.1 HisC-<i>MAGEE1a.13</i></u>	43
II. <u>MUTAGENESE DIRIGEE DE <i>MAGEE1</i></u>	46
II.1. <u>Production des fragments mutés</u>	46
II.2. <u>Insertion des fragments mutés dans pcDNA 3.1 HisC-E1</u>	48
III. <u>TRANSFECTION DE <i>MAGEE1</i> DANS DES CELLULES 293T ET ANALYSE PAR WB</u>	49
IV. <u>TRANSCRIPTION/TRADUCTION IN VITRO DE <i>MAGEE1</i></u>	50
<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	53
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	54

Introduction

I. Les gènes *MAGE*

I.1. La découverte des gènes *MAGE*

C'est en 1991 que le premier gène *MAGE* (Melanoma AntiGEn) fut découvert. En effet, les recherches développées par l'équipe du professeur Th. Boon de l'Institut Ludwig (Bruxelles), qui s'inscrivent dans le cadre de l'immunothérapie cancéreuse, aboutirent à la mise au point d'une méthode permettant d'identifier des gènes codant des antigènes tumoraux, en se basant sur la reconnaissance spécifique des tumeurs par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Afin d'isoler de tels lymphocytes, les cellules de la lignée du mélanome MZ2-MEL du patient MZ2 furent cultivées en présence de lymphocytes du sang de ce patient. L'interaction entre le récepteur des lymphocytes (TCR) et l'antigène présenté par la cellule cible tumorale stimule la prolifération des CTLs. De cette manière, le taux de lymphocytes T dirigés de manière spécifique contre les antigènes présentés en surface des cellules MZ2-MEL s'enrichit considérablement dans la culture mixte tumeur/lymphocytes. Lorsqu'un clone de CTL donné est mis en présence de cellules MZ2-MEL, la quasi-totalité des cellules MZ2-MEL sont lysées. Toutefois, une faible fraction survit et prolifère. Cette « immunosélection » permet d'isoler des variants de perte de l'antigène. Ces variants sont toujours reconnus par d'autres clones CTL, ce qui démontre l'existence de plusieurs antigènes indépendants à la surface des cellules MZ2-MEL. Parmi ceux-ci figure l'antigène MZ2-E (Van den Eynde et al., 1989). Une bibliothèque génomique contenant l'ADN des cellules MZ2-MEL fut alors construite dans le but de cloner le gène codant l'antigène MZ2-E. Le variant de perte MZ2-MEL2.2 fut transformé par transfection d'ADN de cette bibliothèque et les transfectants furent incubés en présence du clone CTL anti-MZ2-E. Les transfectants exprimant l'antigène MZ2-E ont pu être identifiés grâce à leur capacité d'activer le clone CTL anti-MZ2-E. Ainsi, ils ont identifié le premier gène codant pour un antigène tumoral qu'ils baptisèrent *MAGE-1*, aujourd'hui appelé *MAGEA1* (Van der Bruggen et al., 1991). Ce gène ne présentait aucune homologie avec les séquences contenues dans les banques de données publiques de l'époque.

I.1.1. Définition moléculaire de l'antigène MZ2-E

Les antigènes reconnus par les lymphocytes T cytolytiques sont des peptides d'environ 10 acides aminés formés suite à la dégradation de protéines cytoplasmiques par le protéasome (figure 1). Ces peptides sont présentés à la surface des cellules par les domaines extracellulaires du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I). (Rotzschke et al., 1990). Des transporteurs TAP conduisent ces peptides vers le réticulum endoplasmique où ils s'associent aux complexes MHC-I formés par une molécule HLA de type I et la β -2 microglobuline. Ce complexe est alors transporté à la surface de la cellule où il pourra être reconnu par le récepteur TCR d'un CTL. La présentation de ces peptides en surface ne déclenche normalement pas de réponse aux peptides du « soi ». Par contre, si la cellule est infectée par un virus, des peptides viraux pourront être reconnus par des CTL. De la même manière, une réponse immunitaire peut être déclenchée si une cellule cancéreuse exprime une

protéine qui n'est pas présente dans les tissus normaux. L'antigène MZ2-E est un de ces peptides présenté par les molécules HLA-A1 et il provient de la protéine MAGEA1 (Traversari et al., 1992).

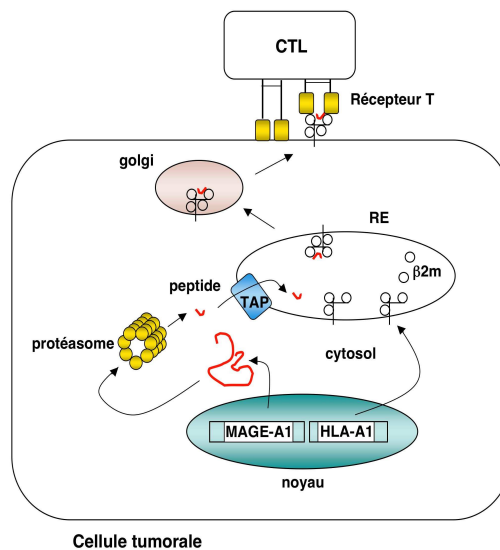


Figure 1 : Mécanisme de présentation d'un antigène à un lymphocyte T cytolytique par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (d'après la thèse de Mathieu Bertrand)

MAGEA1 est silencieux dans les tissus adultes normaux, à l'exception des cellules de la lignée germinale mâle. Il est cependant exprimé dans une fraction variable de tumeurs de différents types histologiques. Son expression dans les tumeurs peut conduire à l'expression d'antigènes tumoraux (cfr supra). Comme les cellules de la lignée germinale mâle n'expriment pas les molécules HLA, les peptides ne sont pas présentés et les antigènes MAGE sont bien spécifiques des tumeurs. Ils sont donc particulièrement intéressants pour l'immunothérapie anti-cancéreuse : une vaccination contre ces antigènes pourrait donc déclencher une réaction immunitaire aboutissant à l'élimination des cellules tumorales.

I.2. Classification des gènes *MAGE*

D'autres gènes *MAGE* ont été identifiés grâce au criblage de bibliothèques d'ADN génomique et d'ADNc avec une sonde *MAGEA1* et au séquençage complet du génome humain et murin. La famille *MAGE* contient 55 gènes chez l'homme et 30 chez la souris. Ces gènes sont classés en sous-familles sur base de leur localisation chromosomique et de leur similarité de séquence. On compte 13 sous-familles de gènes *MAGE* chez l'homme (*MAGEA*, *MAGEB*, *MAGEC*,... et *NECDIN*) et 9 chez la souris (Chomez et al., 2001) (figure 2).

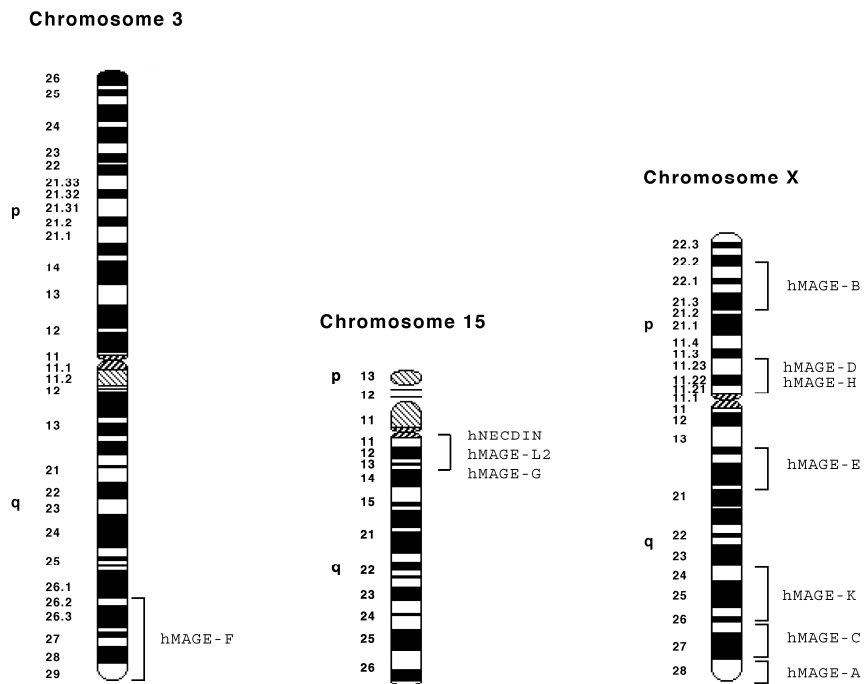


Figure 2. Localisation chromosomique des sous-familles des MAGE chez l'homme (Chomez et al., 2001).

En comparant les séquences des protéines encodées par tous ces gènes, on a identifié une région conservée, d'environ 200 acides aminés, appelée « MAGE Homology Domain » (MHD). Ce domaine est en général localisé du côté carboxy-terminal des protéines MAGE à l'exception des protéines MAGED où il occupe une position plus centrale. C'est la seule région partagée par tous les membres de la famille (Figure 3).

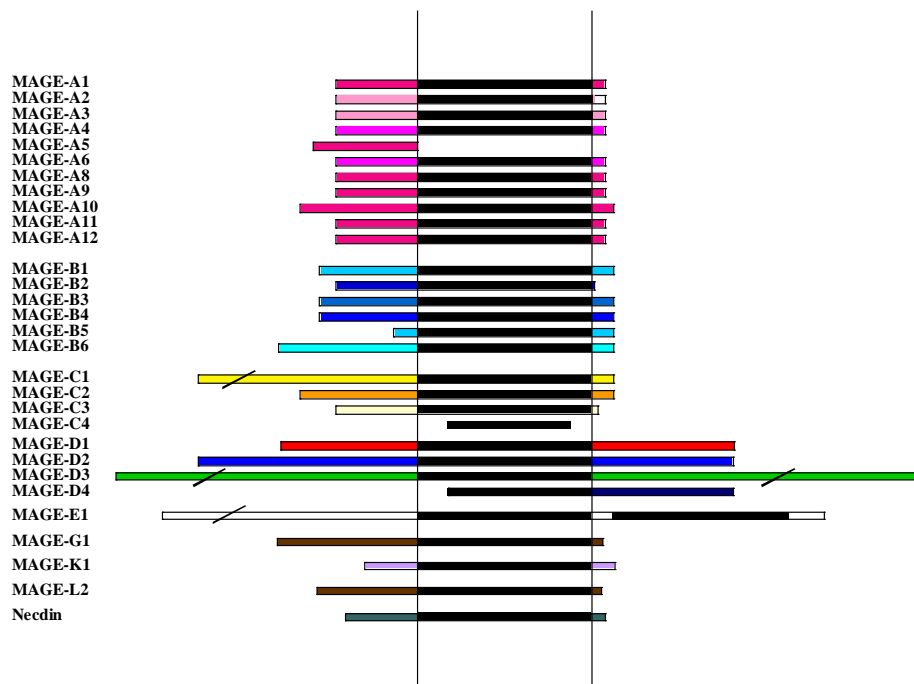


Figure 3 : Représentation schématique de certains gènes MAGE. Le « MAGE Homology Domain » (MHD) est représenté en noir..

Sur base de leur profil d'expression, les gènes *MAGE* peuvent être classés en deux catégories : les gènes *MAGE* de type I et ceux de type II (Chomez et al., 2001).

I.2.1. Les gènes *MAGE* de type I

La catégorie des gènes *MAGE* de type I comporte la majorité des gènes *MAGE*. Leur profil d'expression est caractéristique. En effet, ces gènes sont exprimés dans une portion variable de tumeurs de divers types histologiques ainsi que dans les cellules de la lignée germinale mâle et parfois dans les ovaires et le placenta, tandis qu'ils sont silencieux dans tous les autres tissus adultes (Chomez et al., 2001). L'expression de ces gènes *MAGE* dans les tumeurs est liée à la déméthylation des îlots CpG dans leurs régions promotrices. Cette déméthylation est liée à la progression tumorale, elle induirait une instabilité du génome et l'expression de divers gènes dont les gènes *MAGE* de type I.

La famille des gènes *MAGE* de type I comprend essentiellement les sous-familles *A*, *B* et *C* qui sont localisées en « chapelets » sur le chromosome X. La sous-famille *MAGEC* (q26-27) n'est présente que chez l'homme alors que la sous-famille *MAGEA* (q28) comporte 15 gènes humains et 9 gènes murins. La sous-famille *MAGEB* (q26) compte 17 gènes humains et 10 gènes murins. Il est impossible d'établir des relations d'orthologie paires entre les gènes humains et murins. En effet, les gènes *MAGEA* et *B* humains sont plus proches les uns des autres qu'ils ne le sont des gènes de souris. On peut en conclure que les duplications qui ont généré les membres des deux sous-familles sont ultérieures à la séparation phylogénique entre l'homme et la souris. Ces gènes sont donc peu conservés et évoluent rapidement chez les mammifères. En règle générale, seul le dernier exon des gènes *MAGE* de type I est codant (figure 4).

Les testicules constituent les seuls organes adultes normaux où la majorité des gènes *MAGE* de type I sont exprimés. Il a été démontré par hybridation in situ que les gènes *Magea* et *b* sont exprimés dans les cellules germinales mâle. Les spermatogonies, cellules prémeiotiques, expriment plusieurs gènes *Magea* tandis que les spermatides, cellules haploïdes qui se différencient en spermatozoïdes, expriment les gènes *Mageb1*, *b2* et *b3*. Il y a donc une régulation de l'expression des gènes *Magea* et *b* lors de la spermatogenèse. Les cellules somatiques du testicule (Leydig et Sertoli) n'expriment pas les gènes *Mage* (Clotman et al., 2000).

I.2.1.1. Les gènes *MAGEA*

Après la découverte du gène humain *MAGEA1*, plusieurs autres gènes de la même famille furent découverts. Leur existence a été révélée par l'hybridation d'un southern blot avec une sonde *MAGEA1* qui a fait apparaître d'autres bandes. Onze nouveaux gènes ont été identifiés, *MAGEA2* à *A12*, via le criblage par hybridation d'une bibliothèque de cosmides. A l'exception de *MAGEA11* qui comporte 4 exons codants, la partie codante de tous ces gènes est restreinte au dernier exon (figure 4). La région 5' est beaucoup plus variable et contient deux ou trois petits exons. Les 12 gènes *MAGEA* sont localisés dans la région Xq28 et codent pour des protéines de 314 à 429 acides aminés. La localisation subcellulaire des protéines *MAGEA* est variable : cytosol (*MAGEA3*), noyau (*MAGEA10* et *A11*), cytosol et noyau (*MAGEA1* et *A4*).

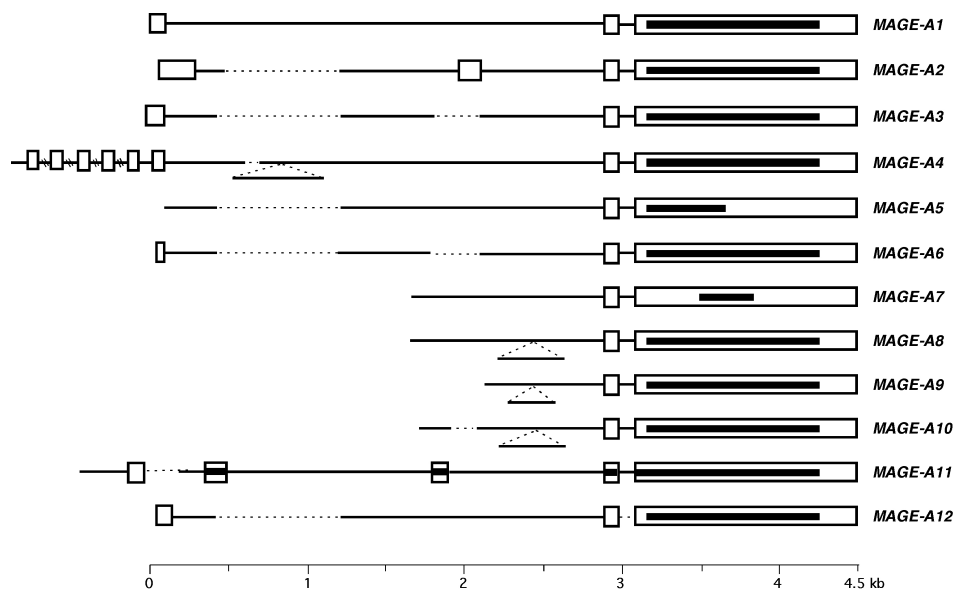


Figure 4: Les 12 gènes *MAGEA*. Les boîtes représentent des exons et les parties noircies désignent la phase ouverte de lecture (De Plaen et al., 1994).

I.2.1.1.1. Le gène *MAGEA1*

En dehors du fait que *MAGEA1* fut le premier gène *MAGE* identifié et que son expression dépend de l'état de méthylation de son promoteur (De Smet et al., 1996), il a été découvert par un système double-hybride que *MAGEA1* interagit physiquement avec SKIP et l'histone déacétylase HDAC1. SKIP (Ski Interacting Protein) est une protéine adaptatrice impliquée notamment dans la transduction du signal de Notch1, un récepteur transmembranaire capital pour les communications intercellulaires et pour les décisions concernant le destin cellulaire durant le développement. La liaison d'un ligand au récepteur Notch1 induit le clivage d'un domaine intracellulaire du récepteur, appelé Notch1-IC, qui régule l'expression de nombreux gènes. L'une des protéines qui interagit avec Notch1-IC est le « C-promoter binding factor 1 » (CBF1). En l'absence de Notch1-IC, CBF1 inhibe la transcription en se liant au complexe SKIP-SMRT contenant des histones déacétylases

(HDAC). La répression est enlevée par la présence de Notch1-IC qui se lie à SKIP et CBF1 écartant ainsi le complexe de répression et permettant l'activation de la transcription par le recrutement d'histone acétyltransférases (HATs) et de co-activateurs tels que Mastermind (Mam) (Figure 5).

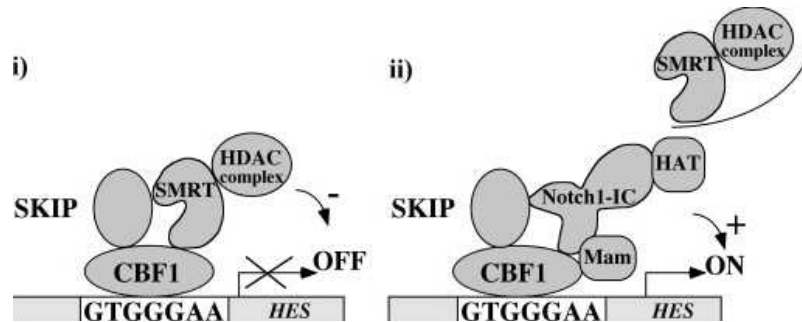


Figure 5 : Transactivation par Notch1-IC. Model d'activation sur promoteur HES (Hairy/Enhancer of Split) de Notch1-IC régulé par CBF1 (selon Zhou et al.). i) Le complexe du corépresseur SMRT contenant des HDAC se lie à SKIP. ii) Notch1-IC interagit avec SKIP et CBF1, déplaçant le complexe du corépresseur SMRT, et active la transcription des gènes HES par le recrutement de Mam et de HATs.

L'action de MAGEA1 est à la fois passive et active dans ce système. En effet, MAGEA1 intervient en se liant à SKIP par sa région C-terminale ce qui empêche Notch1-IC de se lier à SKIP. De ce fait, Notch1-IC ne peut plus recruter Mam et les HATs et activer la transcription de certains gènes. De plus, MAGEA1 se lie à et recrute HDAC1 qui modifie la chromatine. Ainsi, MAGEA1 interfère avec l'activité transcriptionnelle de Notch1-IC dépendante de SKIP (figure 6) (Laduron et al., 2004).

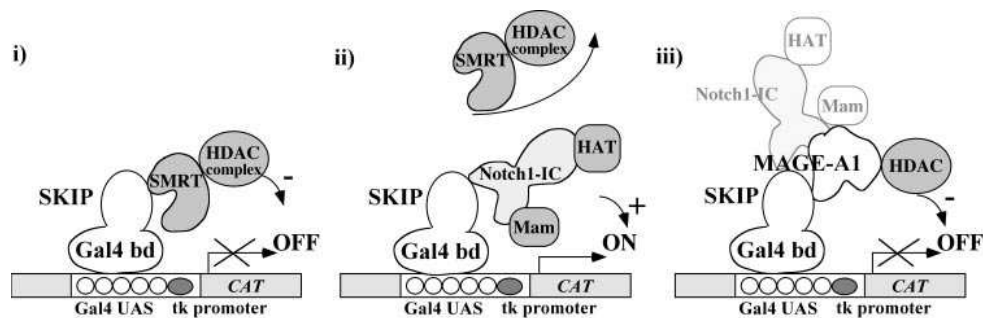


Figure 6 : MAGE-A1 contrecarre la transactivation par Notch1-IC et recrute HDAC. i) et ii) Résumé des données expérimentales utilisant Gal4bd et SKIP, Notch1-IC et le rapporteur CAT en accord avec le modèle de Zhou et al. iii) En se liant à SKIP et en recrutant HDAC, MAGE-A1 interfère avec la transactivation par Notch1-IC et réprime la transcription (Laduron et al., 2004).

I.2.1.1.2. Le gène *MAGEA4*

Ce gène possède plusieurs promoteurs qui génèrent autant de premiers exons épissés de manière alternative (figure 4). Du fait qu'il possède une région C-terminale semblable à *MAGEA1*, il est aussi capable d'interagir avec SKIP (Laduron et al., 2004). Néanmoins, sa liaison avec l'oncoprotéine gankyrine est, elle, beaucoup plus spécifique. La gankyrine est une oncoprotéine qui consiste en une répétition de six ankyrine et d'une extension N-terminale de 38 acides aminés. Cette protéine, surexprimée dans la plupart des carcinomes hépatocellulaires, se lie avec diverses protéines dont Rb et Cdk4. Cette action entraîne la perte de signaux inhibiteurs de la croissance cellulaire impliqués dans l'apparition de tumeurs. *MAGEA4* est capable d'interagir avec la gankyrine et d'inhiber son activité « tumorigénique » (Nagao et al., 2003) sans toutefois avoir une implication, par lui-même, dans la progression du cycle cellulaire ou dans l'apoptose.

Cependant, un fragment C-terminal de 107 acides aminés de *MAGEA4* (*MAGEA4ΔN1*) montre une capacité à induire l'apoptose de manière dépendante et indépendante de p53. En effet, son expression dans des cellules (U-2 OS) induit l'augmentation du taux de p53 mais diminue la transcription de p21^{Cip1}, protéine au rôle principal dans l'effet cytostatique médié par p53 après divers stress cellulaires (radiations, choc thermique, hypoxie,...). Récemment, il a été démontré que Myc influence le sort de la cellule après activation de p53 : arrêt de la prolifération cellulaire ou apoptose. Pour ce faire, Myc est recruté au promoteur de p21^{Cip1} par sa liaison avec Miz-1 et il bloque ainsi la transcription de p21^{Cip1} induite par p53. Cette liaison a pour conséquence de faire passer la cellule de l'état quiescent à l'état apoptotique. *MAGEA4ΔN1* intervient dans ce système par sa liaison avec Miz-1 et son recrutement au niveau du promoteur de p21^{Cip1} qui entraîne l'inhibition de l'expression de p21^{Cip1} et la sensibilisation des cellules au signal pro-apoptotique dépendant de p53 (figure 7) (Sakurai et al, 2004).

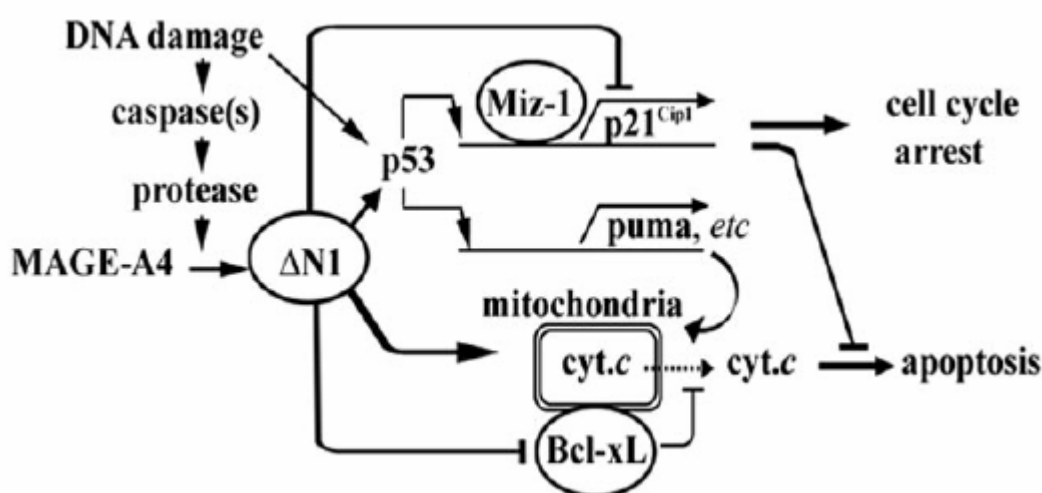


Figure 7 : Modèle des mécanismes de l'apoptose induite par *MAGEA4ΔN1*. *MAGEA4* est clivé par une activité protéase dépendant des caspases spécialement quand il est exposé à un stress génotoxique, pour générer *MAGEA4ΔN1* qui inhibe la transcription de p21^{Cip1} en liant Miz-1 et augmente le taux de protéines p53 conduisant à l'induction de gènes pro-apoptotiques. De plus, *MAGEA4ΔN1* diminue le taux de protéines Bcl-xL. Tous ces effets contribuent à la mort cellulaire (Sakurai et al., 2004).

L'activité pro-apoptotique de la partie C-terminale, homologue à MAGEA4 Δ N1, d'autres protéines de la famille MAGEA a aussi été étudiée. Les résultats suggèrent que les domaines C-terminaux de MAGEA1, A2 et A12 augmenteraient l'apoptose mais de façon moindre que celle de MAGEA4 (Sakurai et al., 2004).

I.2.2. Les gènes MAGE de type II

Les gènes MAGE de type II sont ceux des sous-familles *MAGED*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L* et le gène *Necdin*. Ces gènes ont un profil d'expression très différent de celui des gènes de type I. En effet, ils sont exprimés dans de nombreux tissus somatiques normaux au cours du développement et chez l'adulte (Bertrand et al., 2004). Chez l'homme, les gènes *MAGED*, *E*, *H*, *I*, *J* et *K* sont situés sur le chromosome X, les gènes *MAGEG*, *L* et *Necdin* sont dans la région q11-q13 du chromosome 15 et le gène *MAGEF* est sur le chromosome 3 (figure 2).

La sous-famille de gènes de type II *MAGED*, qui comprend 4 gènes chez l'homme et 3 chez la souris, est particulièrement intéressante. La structure de ces gènes diffère totalement de celle de tous les autres *MAGE*. En effet, ces gènes sont constitués de 13 exons dont 11 sont codants alors que dans tous les autres gènes *MAGE*, l'ORF (Open Reading Frame) est codée par le seul dernier exon (Figure 8). Ceci indique que les gènes *MAGED* sont les gènes originels à partir desquels tous les autres *MAGE* ont été générés par rétroposition et duplication. De plus, contrairement à la plupart des autres *MAGE*, les gènes *MAGED* ont été bien conservés (grande similarité entre gènes humains et murins) au cours de l'évolution des mammifères, ce qui suggère qu'ils exercent des rôles importants.

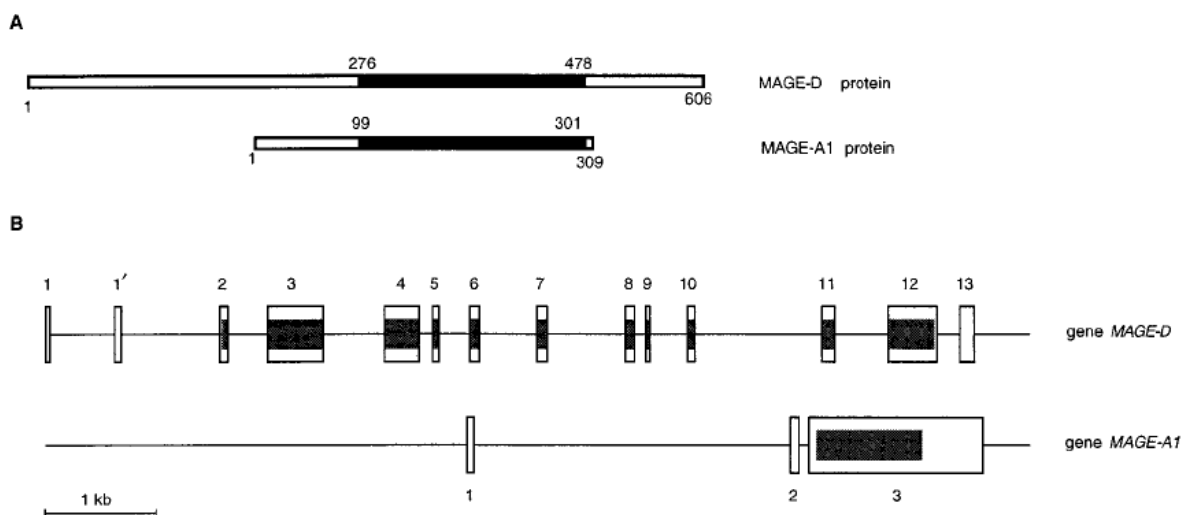


Figure 8 : A) comparaison des protéines *MAGED* et *MAGEA1*. Les carrés noirs représentent les régions d'homologie. La position des acides aminés y est indiquée. B) structure exon-intron du gène *MAGED1* et du gène *MAGEA1* (représentative de tous les autres gènes *MAGE*). Les traits représentent les introns ; les carrés blancs, les exons ; et les carrés noirs, les séquences codantes. D'après Lucas et al., 1999

Parmi les gènes *MAGE* de type II, les deux gènes qui ont été le mieux caractérisés sont *MAGED1* et *Necdin*.

I.2.2.1. Necdin

Necdin est un gène *MAGE* mono-exonique situé dans la région q11-13 du chromosome 15 et qui code une protéine nucléaire de 325 acides aminés très conservés entre l'homme et la souris.

Cette protéine est un inhibiteur de croissance essentiellement exprimé dans les cellules post-mitotiques (certains neurones et cellules musculaires) au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte (Uetsuki et al., 1996 ; Andrieu et al., 2003). Necdin interagit avec le facteur de transcription E2F1 qui intervient dans la régulation de l'expression de gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire, et plus particulièrement à l'entrée des cellules en phase S (Taniura et al., 1998). E2F1 est capable de se lier à Rb (protéine du rétinoblastome), un suppresseur tumoral, selon son état de phosphorylation. En effet, lorsque Rb est hypophosphorylé (phase G1) il lie E2F1 et réprime son activité transcriptionnelle, ce qui empêche la cellule d'entrer dans la phase S. Lors de la transition de la phase G1 à la phase S, Rb est phosphorylé (cyclines et cdk) et libère E2F1 qui active alors la transcription de gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et dans le contrôle de la croissance cellulaire (figure 9). Tout comme Rb, Necdin interagirait avec E2F1 et empêcherait l'entrée des neurones dans le cycle cellulaire (Taniura et al., 1998 et 1999)

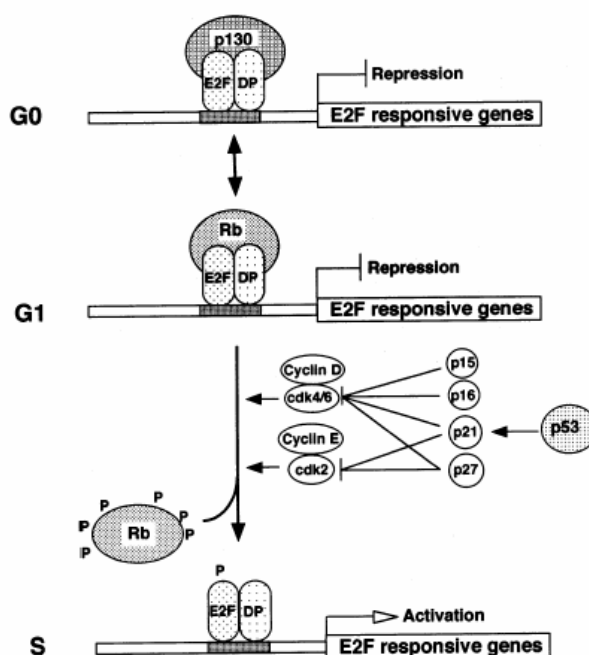


Figure 9 : Représentation schématique de facteurs de régulation du cycle cellulaire impliqués dans la transition de la phase G0/G1 à la phase S (Yoshikawa, 2000).

Necdin pourrait aussi se lier à p53, réprimant ainsi son activité transcriptionnelle. Une surexpression de Necdin protégerait les cellules de l'apoptose induite par p53. Ces résultats suggèrent que Necdin pourrait être responsable du maintien de l'état post-mitotique des neurones et avoir un rôle dans la survie de certaines cellules du SNC (Taniura et al., 1999 et 1998).

Chez l'homme, la région chromosomique où se situe le gène *Necdin* subit une empreinte génétique de sorte que seuls les allèles paternels des gènes de cette région sont

exprimés (Mac Donald et al., 1997). Des microdélétions dans cette région constituent la cause de 70% des cas de syndrome de Prader-Willi (PWS). Cette maladie, dont l'incidence est de 1/10.000 à 1/30.000, est caractérisée par une hypotonie néonatale majeure, des difficultés alimentaires, une hyperphagie entraînant une obésité, une déficience mentale, le plus souvent modérée, des difficultés d'apprentissage, des troubles variables du comportement, un retard statural et pubertaire (hypogonadisme). Chez la souris, la région C du chromosome 7 est synténique à la région 15q11-q13 de l'homme et contient des gènes homologues dont *Necdin*. Afin d'évaluer l'implication de la déficience en *Necdin* dans le PWS, des souris déficientes en *Necdin* ont été générées. Une fraction variable des souriceaux déficients en *Necdin* meurt dans les 1 à 2 jours qui suivent la naissance. Cette létalité serait due à une déficience des réflexes respiratoires et dépend du fond génétique des animaux. De plus, certains déficits qui rappellent ceux du syndrome de Prader-Willi se retrouvent chez les survivants déficients en *Necdin*. Parmi ceux-ci il y a une réduction en neurones produisant l'ocytocine et la LHRH (Lutenizing Hormone-Releasing Hormone) dans l'hypothalamus et un retard de croissance (Muscatelli et al., 2000).

I.2.2.2. Le gène *MAGED1*

Le gène *MAGED1* (aussi appelé *NRAGE* et *Dlxin-1* suivant l'espèce considérée) est situé sur le chromosome X dans la région p11.23 et code pour une protéine de 778 acides aminés. Chez l'homme, *MAGED1* est exprimé au niveau du cerveau, du foie et des reins du fœtus, tandis qu'il est essentiellement présent dans le cerveau chez l'adulte (Bertrand et al., 2004). Des études, réalisées in vitro, ont montré que *MAGED1* agit comme modulateur transcriptionnel impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose via des interactions avec divers partenaires qui furent identifiés par la technique du double hybride.

p75NTR :

p75NTR est un membre de la famille des récepteurs au TNF (tumor necrosis factor) capable de lier les 4 différentes neurotrophines avec une affinité semblable. Les neurotrophines sont des facteurs de croissance ayant des rôles dans divers phénomènes tels que le développement, la survie et la mort des cellules nerveuses. Il existe 4 neurotrophines chez les mammifères : le NGF (nerve growth factor), le BDNF (brain-derived neurotrophic factor), la NT-3 (neurotrophin 3) et la NT-4/5 (neurotrophin 4/5). Il y a deux types de récepteur pour les neurotrophines : p75NTR, et les Trk (famille des récepteurs tyrosines kinases).

Lorsque p75NTR et TrkA, l'un des membre de la famille Trk, sont coexprimés, p75NTR facilite la liaison de NGF à TrkA et de ce fait augmente l'activation de TrkA et le signal de survie dépendant de NGF (Roux et Barker, 2002). p75NTR est également exprimé dans des cellules qui n'expriment pas de récepteurs Trk et possède dans ces cellules une activité autonome proapoptotique. En effet, il a été démontré que p75NTR est capable d'induire la mort cellulaire via un domaine Chopper qui ressemble au « fas death domain » mais qui ne fait pas intervenir les protéines adaptatrices FADD et TRADD. De ce fait, p75NTR possède un mécanisme de signalisation apoptotique qui diffère des autres membres de la superfamille des récepteurs TNF.

C'est dans cette optique qu'une interaction entre MAGED1 et p75NTR a été identifiée. Celle-ci a pour conséquence d'empêcher la liaison entre p75NTR et TrkA ce qui résulte en une inhibition de la progression du cycle cellulaire et une facilitation de l'apoptose dépendante de p75NTR. MAGED1 déclenche une cascade apoptotique mitochondriale (libération de cytochrome *c* et activation des caspases 3, 7 et 9) via une voie dépendante des JUN kinases et du facteur de transcription c-jun (Figure 10) (Salehi et al., 2002).

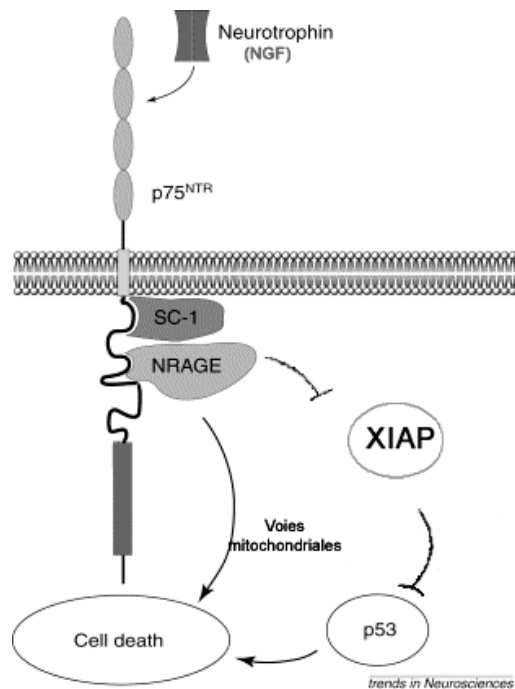


Figure 10 : Modèle d'action de MAGED1 (NRAGE) sur l'apoptose en réponse à la liaison de NGF à p75NTR.

A côté de ces études in vitro, l'analyse de souris déficiente en *Maged1* a démontré que *Maged1* n'est pas nécessaire au développement normal de la souris, mais qu'une déficience en *Maged1* conduit à un manque d'apoptose dans certaines structures en développement (Bertrand et al., soumis à publication). Certains aspects phénotypiques de la déficience en *Maged1* (retard de la phase catagène du follicule pileux et l'apoptose réduite des motoneurones) sont aussi observés chez les animaux déficients en p75NTR, ce qui valide le lien fonctionnel observé in vitro entre ces deux protéines.

UNC5H1 :

Cette protéine est un membre de la famille des récepteurs de type UNC5H sensible à la nétrine-1 et impliqué dans l'orientation axonale, la migration cellulaire et l'apoptose. MAGED1 est impliqué dans le signal apoptotique médié par UNC5H1. MAGED1 lie ce récepteur au niveau de sa région juxtamembranaire qui contient un domaine PEST (Proline, Acide glutamique, Sérine et Thréonine) capable d'induire l'apoptose. Cette configuration est semblable à celle de p75NTR avec lequel MAGED1 se lie également au niveau de la région juxtamembranaire contenant un domaine PEST ce qui conduit à l'induction de l'apoptose. UNC5H1 et p75NTR partagent des similarités structurales et de la sorte, MAGED1 pourrait

induire l'apoptose via des mécanismes similaires pour les deux récepteurs (XIAP, JNK) (Williams et al., 2003).

Dlx5/Msx2 :

Ces protéines sont des membres de la famille des protéines à homéodomaines Dlx/Msx. Elles jouent un rôle crucial dans le développement et la réparation des os. MAGED1, via son motif répété WQXPXX, interagit avec Dlx5 et, via son domaine MHD, il interagit avec Msx2. Par ces liaisons, il activerait la transcription dépendante de Dlx5. MAGED1 ne semble pas avoir d'activité de transactivation par lui-même mais serait une protéine adaptatrice qui stabiliserait ou servirait de pontage pour le complexe Dlx5 et ses coactivateurs (Masuda et al., 2000 et 2001).

Praja1 :

Cette protéine à domaine « RING finger » se lie à MAGED1 et agit envers lui comme une ubiquitine ligase E3 entraînant sa dégradation ainsi que celle de Msx2. Cette dégradation de MAGED1 provoque une répression de l'activité de transcription de Dlx5 mais cette action n'est pas la seule cause de la répression car une inhibition du protéasome ne rétablit pas totalement l'inhibition que subit Dlx5 (Sasaki et al., 2002).

IAPs :

Les protéines IAPs (inhibitor of apoptosis) favorisent la survie cellulaire en liant les caspases par leur domaine BIR (séquence située en N-term, et riche en cystéine). En conséquence, ces protéines inhibent les caspases et l'apoptose pour favoriser la survie cellulaire. MAGED1 interagit avec certains membres de cette famille de protéines dont les ITAs (inhibitor of T cell apoptosis) et les XIAPs (X-linked inhibitor of apoptosis) via leur domaine en doigt de zinc. Ces liaisons entraînent l'accélération du clivage des IAPs et favorisent l'apoptose (Jordan et al., 2001).

Ror2 :

Ror 2 est une protéine de la famille des récepteurs tyrosine kinases qui joue un rôle crucial dans la morphogenèse du cœur et du squelette. Ror 2 régulerait la distribution subcellulaire de Maged1. En effet, l'association entre Maged1 et Msx2 est perturbée par la présence de Ror 2 : Ror 2 séquestrerait Maged1 dans les compartiments membranaires, ce qui empêcherait Maged1 de s'associer avec Msx2 dans le noyau où il effectue sa fonction de modulateur transcriptionnel (Matsuda et al., 2003).

I.2.2.3. Le gène *MAGED2*

L'expression de *Maged2* chez l'embryon de souris, complémentaire à celle de *Maged3*, est faible dans le cerveau et importante dans le reste du corps, notamment dans les muscles lisses et striés squelettiques. Par contre, à la naissance on observe la présence de *Maged2* dans les régions prolifératives et en différenciation du cerveau. Chez l'adulte (P60), *Maged2* n'est plus détecté dans le cerveau (Bertrand et al, 2004). Chez l'homme, des résultats semblables ont été obtenus pour l'embryon mais pas pour l'adulte où il est exprimé dans le cerveau (Bertrand et al, 2004).

I.2.2.4. Le gène *MAGEE1*

Chez l'homme, *MAGEE1*, aussi appelé *DAMAGE* pour « dystrobrevin associated Melanoma AntiGEn », est un gène situé en Xq13.1 : la partie transcrit est longue 3628 paires de bases et contient une ORF unique de 2874 nucléotides. Le profil d'expression de ce gène chez la souris adulte est ubiquiste mais présente un niveau d'expression plus important dans le cerveau. Dans ce dernier, *Magee1* est exprimé dans les corps cellulaires et les dendrites des neurones du gyrus denté et dans les cellules pyramidales de l'hippocampe. En dehors du SNC, *Magee1* se localise aux synapses neuromusculaires au niveau d'un compartiment sous-membranaire directement en dessous de la synapse (Albrecht et al., 2003).

La protéine *MAGEE1* comporte plusieurs caractéristiques structurales :

- 2 MHD en C-terminal, dont l'un est tronqué
- Une région de 30 répétitions contiguës de 12 résidus avec la séquence consensus A(S/T)EGPSTSVPT qui n'est semblable à aucune répétition connue.
- Une hyperphosphorylation possible sur sérine/thréonine dans la région de répétition du gène humain puisqu'elle possède 39 sites qui ont une séquence consensus reconnue par la protéine kinase C et la caséine kinase.
- Des séquences riches en prolines, sérines, thréonines et résidus acides (séquences PEST), dans la région de répétition, qui peuvent être des cibles pour la dégradation par le protéasome 26S ou par la calpaïne
- Une région riche en résidus basiques (SRRRRRRVAKATA) en N-terminal pourrait constituer un signal de localisation nucléaire (NLS). De plus, la séquence en amont du NLS potentiel est très conservée entre l'homme, le macaque et la souris, ce qui suggère que cette séquence pourrait être impliquée dans l'adressage de la protéine ou avoir une autre fonction

La présence d'un NLS potentiel et les observations en immunofluorescence montrant que *MAGEE1* réside dans les noyaux et les compartiments périnucléaires de cellules musculaires suggèrent que *MAGEE1* pourrait se déplacer entre le complexe membranaire dystrobrevine-dystrophine et le noyau (Albrecht et al., 2003).

Le seul élément connu potentiellement impliqué dans la fonction de MAGEE1 est son interaction avec la région N-terminale de l' α -dystrobrevine. Cette interaction requiert dans MAGEE1 une portion de 214 acides aminés du côté C-terminal qui comprend le deuxième MHD. Dans l' α -dystrobrevine une région de 286 acides aminés en aval de son domaine « ZZ », un type de doigt de zinc, est requise pour son interaction avec MAGEE1 (figure 11).

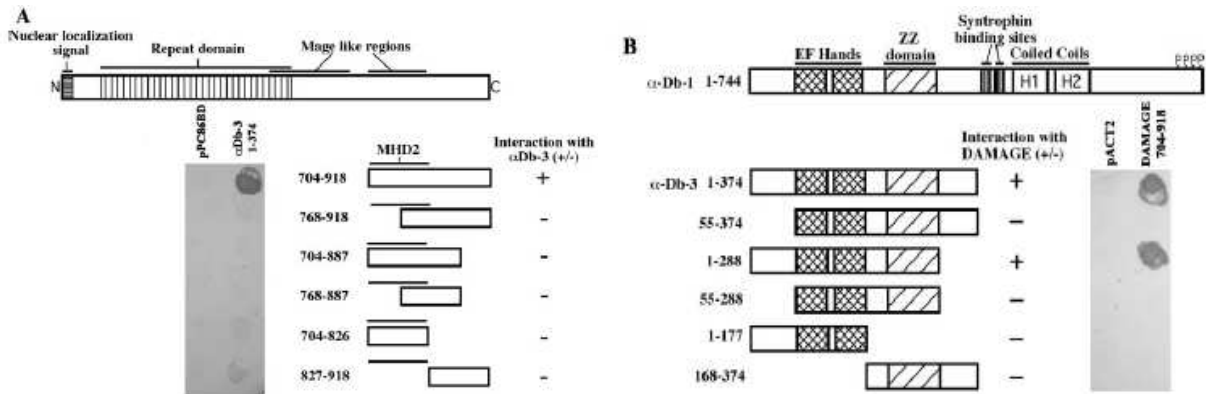


Figure 11 : Représentation des régions de MAGEE1(A) et de l' α -dystrobrevine (B) requises pour leur interaction d'après Albrecht et al., 2003.

L'analyse de la distribution de MAGEE1 dans les cellules déficientes en α -dystrobrevine ne révèle aucune différence de localisation que se soit au niveau des jonctions neuromusculaires (JNM) ou des nerfs périphériques. Cette observation suggère que MAGEE1 possède d'autres partenaires d'interaction que l' α -dystrobrevine (Albrecht et al., 2003).

II. Dystrophine et dystrobrevine*

*le lecteur pressé peut ignorer cette partie de l'introduction qui n'est pas nécessaire à la bonne compréhension de la section « résultats et discussion ».

II.1. La dystrophine

Le gène de la dystrophine est le plus long connu chez l'homme et la souris avec ses 2.4 Mb situé en Xp21 et ses 79 exons qui codent un transcript de 14 Kb. Toutefois, des formes d'épissages alternatifs existent et sont transcrits par au moins sept promoteurs spécifiques à certains tissus. Trois de ces promoteurs reflètent les sites majeurs d'expression de la dystrophine. Le « brain promoter » dans les neurones corticaux et l'hippocampe, le « Purkinje promoter » dans les cellules de Purkinje et les cellules musculaires squelettiques et le « muscle promoter » dans les cellules musculaires squelettiques et cardiaques (Blake et al., 2002).

La protéine codée par ce gène fait partie de la famille des protéines β -spectrine/ α -actinine. Elle est composée de quatre domaines fonctionnels (figure 12). Comme les autres membres de cette famille de protéines, la dystrophine comporte un domaine de liaison à l'actine qui permet l'ancrage du complexe de la dystrophine avec le cytosquelette. Le second domaine de la dystrophine est le « rod » domaine qui constitue plus de 70% de la longueur de la protéine et contient chez les vertébrés 24 répétitions de type spectrine (triple hélice). Le troisième domaine de la dystrophine est un domaine riche en cystéine hautement conservé. Ce domaine contient un motif WW riche en proline qui permet la liaison entre la dystrophine et le β -dystroglycan. Ce domaine inclut également des « EF hands » qui pourraient lier le calcium. Enfin, le domaine riche en cystéine comprend un motif ZZ, similaire à un doigt de zinc, capable de lier la calmoduline en présence de calcium. L'extrémité C-terminale est un domaine coiled-coil (CC) capable de lier la dystrobrevine, les syntrophines et d'autres protéines associées au complexe de la dystrophine (Roberts et al., 2001 ; Lapidos et al., 2004).

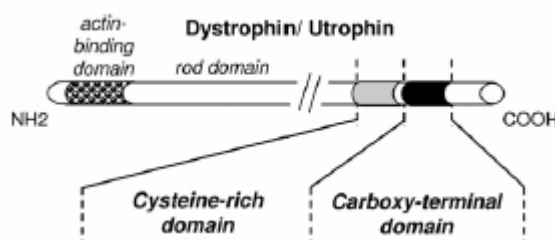


Figure 12 : Représentation des domaines de la dystrophine. Du côté N-terminale, un domaine de liaison à l'actine permet l'ancrage du complexe de la dystrophine avec le cytosquelette. Ensuite, un « rod domain » contenant des répétitions de type spectrine est prolongé par un domaine riche en cystéine. Enfin, un domaine coiled-coil en C-terminal est capable de lier diverses protéines associées au complexe de la dystrophine (d'après Rees et al., 2006).

II.2. Le complexe de la dystrophine

Le complexe de la dystrophine possède une partie qui participe à l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire par la formation d'un lien entre l'actine du cytosquelette et des composants de la matrice extracellulaire (agrane, laminine,...). Le complexe de la dystrophine sert aussi d'échafaudage qui concentre et stabilise, au niveau de la membrane, diverses protéines impliquées dans des voies de signalisation encore mal connues. Hormis la dystrophine, ce complexe protéique est composé de divers éléments dont les sarcoglycanes, les dystroglycanes, les dystrobrevines, le sarcospan, la synthase d'oxyde nitrique et la cavéoline-3 (figure 13) (Blake et al., 2001).

Les six sarcoglycanes (α , β , γ , δ , ϵ , et ζ) forment des complexes transmembranaires ayant au moins un site de glycosylation. Les sarcoglycanes- α et $-\epsilon$ sont dits de type I et sont très semblables tandis que les autres sarcoglycanes sont de type II. Leur rôle précis est encore à préciser. Toutefois, l'étude de tissus musculaires déficients en sarcoglycanes démontre qu'ils ne sont pas nécessaires à la localisation du complexe de la dystrophine mais bien à l'intégrité membranaire (Lapidos et al., 2004).

Le sarcospan est un membre de la famille des tétraspanines qui requiert la présence des sarcoglycanes pour stabiliser le complexe membranaire. Les muscles déficients en sarcospan ne montrent aucune caractéristique des myopathies liées au complexe de la dystrophine. Cette absence de phénotype résulterait du fait que la famille des tétraspanines est très grande et donc que d'autres membres pourraient compenser la perte du sarcospan.

Dans d'autres tissus, les tétraspanines sont impliquées dans des voies de signalisation induites par les intégrines (Lapidos et al., 2004).

La cavéoline-3 est exprimée exclusivement dans les muscles striés et comme les autres formes de cavéoline, elle est capable de s'oligomériser pour former une cavéole, petite invagination membranaire, qui participe à l'organisation membranaire et à la capture de solutés. Les cavéoles sont aussi des sites d'ancrage pour des protéines de signalisation. Il a été récemment démontré que la présence de la cavéoline-3 est critique pour la localisation de src aux « lipids rafts » et que la perte de la cavéoline-3 en membrane entraîne une accumulation de « src » autour du noyau et une augmentation de l'apoptose des myofibres (Lapidos et al., 2004).

La synthase d'oxyde nitrique (nNOS) est liée au complexe de la dystrophine et intervient au niveau des muscles squelettiques dans la vasoconstriction.

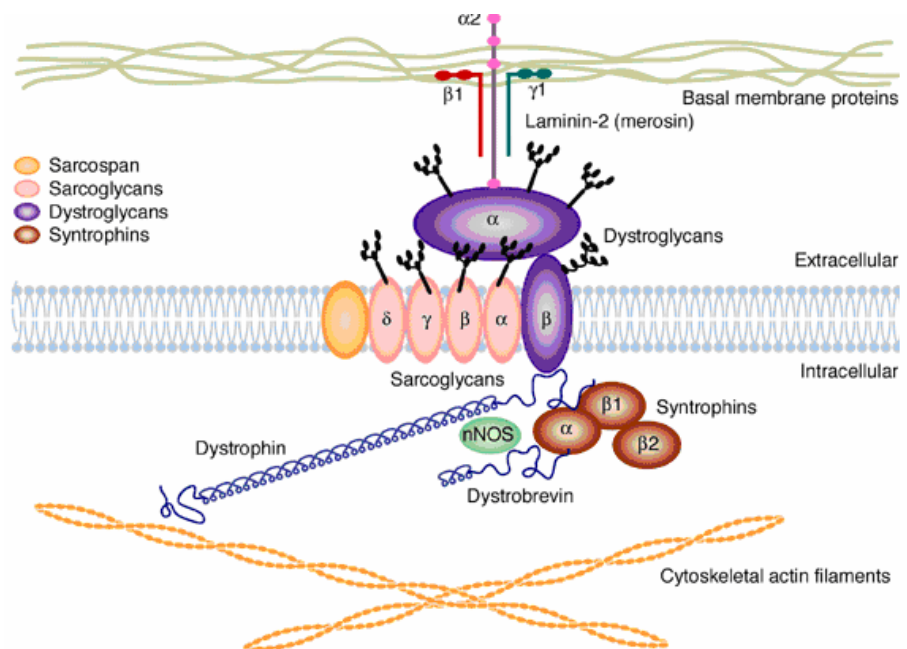


Figure 13 : Schéma du complexe de la dystrophine. La dystrophine forme un lien entre l'actine du cytosquelette et la matrice extracellulaire via les dystroglycans. Le sarcospan et les sarcoglycans stabilisent le complexe membranaire. Un complexe intracellulaire comprenant les syntrophines, la dystrophine et la dystrobrevine stabilise la nNOS dans une position subsarcolemmale (Expert Reviews in Molecular Medicine © Cambridge University Press ISSN 1462-3994).

II.2.1. La dystrobrevine

La dystrobrevine est une protéine faisant partie du complexe de la dystrophine dont elle pourrait médier une partie des fonctions de signalisation. En effet, des souris déficientes en α -dystrobrevine montrent des pathologies musculaires mais sans la fragilité membranaire caractéristique des dystrophies musculaires résultant d'une déficience en dystrophine. De plus, il a été récemment démontré que la dystrobrevine peut compenser en partie la perte de la

dystrophine chez *C. elegans*, suggérant que ces deux protéines participent à des voies de signalisation similaires dans le muscle (Blake et al., 2002).

Deux gènes codent pour les protéines de la famille de la dystrobrevine. Le gène de l' α -dystrobrevine est localisé sur le chromosome humain 18 en 18q12.1-12.2 et code plusieurs isoformes différentes. Trois isoformes majeures, α -dystrobrevine-1, -2 et -3, sont présentes dans les muscles squelettiques et cardiaques murins (figure 14). Une complexité additionnelle est générée par la présence de trois promoteurs et par un épissage alternatif. Le promoteur musculaire est actif dans les muscles squelettiques et cardiaques et conduit à l'expression des trois isoformes de l' α -dystrobrevine. Ce promoteur contient plusieurs sites permettant la liaison de facteurs de régulation spécifiques aux muscles tels que la myogénine et le MEF-1 qui sont activés durant la différenciation musculaire. Durant le développement des souris, l' α -dystrobrevine-1 est exprimée en premier dans des tissus non-musculaires (SNC, épithéliums,...) et suit l'induction de divers processus de différenciation. Dans la plupart de ces tissus, l'expression de l' α -dystrobrevine-1 disparaît avec la progression du développement. Les 3 isoformes de l' α -dystrobrevine sont présentes au niveau du sarcolemme dans des cellules musculaires normales tandis que dans les cellules déficientes en dystrophine, l' α -dystrobrevine est sévèrement réduite. L' α -dystrobrevine se situe également au niveau de la jonction neuromusculaire (JMN) mais sa présence persiste à cet emplacement dans les cellules déficientes en dystrophine ce qui indique que le mécanisme d'ancrage du complexe de la dystrophine dans les JMN est différent de celui au niveau du sarcolemme. Le gène de la β -dystrobrevine est localisé sur le chromosome humain 2 en 2p22-23. La β -dystrobrevine n'est pas exprimée dans les muscles mais est abondante dans le cerveau, les poumons, le rein et le foie (Rees et al., 2006).

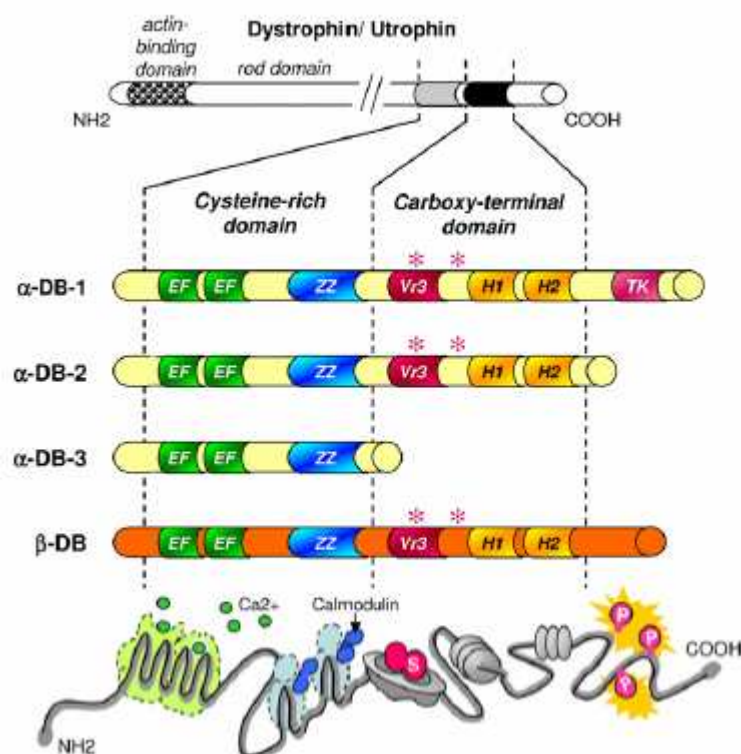


Figure 14 : Représentation schématique des différents isoformes de la dystrobrevine. L' α -dystrobrevine (α -DB) et la β -dystrobrevine (β -DB) ont toutes les deux des régions d'homologie avec les domaines riches en cystéines et avec la région C-terminale de la dystrophine/utrophine. Les molécules peuvent être divisées en plusieurs régions, deux « EF-hand » (vert) qui lient le Ca^{2+} ; le domaine ZZ (bleu), un type de doigts de zinc qui

pourrait fonctionner comme un site de liaison à la calmoduline ; une région Vr3 (rouge) qui contient l'un des deux sites de liaison aux syntrophines (astérisque) ; un domaine coiled-coil (CC) composé de deux « hélical leucine-heptad motifs » (jaune) et capable de lier la dystrophine ; et le domaine substrat de tyrosines kinases (TK) (Rees et al., 2006).

La dystrobrevine peut être divisée en plusieurs régions (figure 13) : deux « EF-hand » qui lient le Ca^{2+} ; le domaine ZZ, un type de doigts de zinc qui pourrait fonctionner comme un site de liaison à la calmoduline ; une région Vr3 qui contient l'un des deux sites de liaison aux syntrophines ; un domaine coiled-coil (CC) composé d'un domaine substrat de tyrosines kinases (TK) ; et deux « hélical leucine-heptad motifs » (H1 et H2) capables de lier la dystrophine/utrophine (Rees et al., 2006).

La dystrobrevine n'ayant pas d'activité enzymatique propre, elle joue probablement un rôle de protéine adaptatrice dans les voies de signalisation du complexe. Dans ce cadre, plusieurs protéines, outre MAGEE1, interagissent avec la dystrobrevine telles que la syncoiline (Newey et al., 2001) et la desmoline, protéines liées aux filaments du cytosquelette, la dysbindine (Rees et al. 2006) et les syntrophines qui semblent jouer un rôle dans la formation des JNM et dans la contraction musculaire (figure 15) (Grisoni et al., 2003).

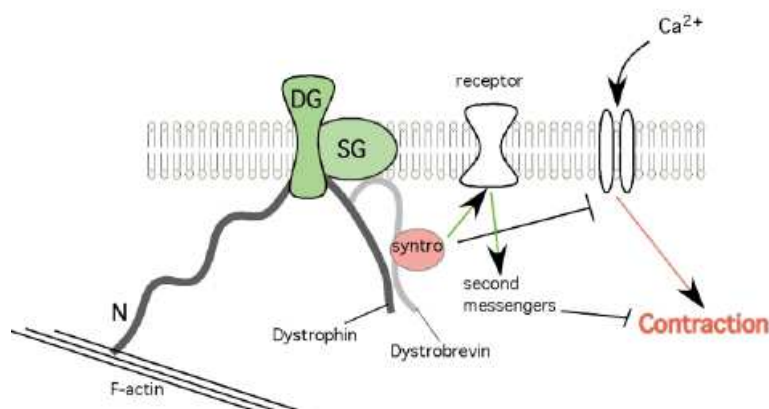


Figure 15 : Modèle de l'action du complexe dystrophine/syntrophine sur les cellules musculaires de C. elegans. La dystrophine est liée à l'actine-F intracellulaire par sa région N-terminale et à un complexe transmembranaire de protéines principalement composé de dystroglycane (DG), sarcoglycane (SG). Les syntrophines (Syntro) peuvent se lier à la dystrophine via la dystrobrevine. Elles peuvent aussi diminuer le flux de calcium et, par conséquent, l'activité musculaire par un mécanisme encore inconnu mais pouvant impliquer des récepteurs et des messager secondaires non identifiés (Grisoni et al., 2003).

II.2.2. Dystroglycane et cancers

Le dystroglycane (DG) est un récepteur cellulaire exprimé dans une variété de tissus (muscles, épithélium, neurones,...). Il interagit avec des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) telles que la laminine, le perlecan et l'agrane (Winder et al., 2001) et des protéines membranaires comme les neurexines (Sugita et al., 2001). Le dystroglycane est codé par un seul gène, DAG1, sur le chromosome 3 humain. Son transcrit code un précurseur de 895 acides aminés chez les vertébrés supérieur qui, après un clivage post-traductionnel, libérera deux sous-unités, l' α -dystroglycane et le β -dystroglycane. L' α -dystroglycane est une

protéine extracellulaire hautement glycosylée dont le poids moléculaire varie de 120 à 180 kDa selon le tissu considéré. Le β -dystroglycane est une protéine transmembranaire de 43 kDa qui forme avec l' α -dystroglycane un complexe fonctionnel membranaire qui relie la membrane basale extracellulaire, la membrane cellulaire et le cytosquelette par sa liaison avec la dystrophine/utrophine (Figure 16) (Sgambato et al., 2005).

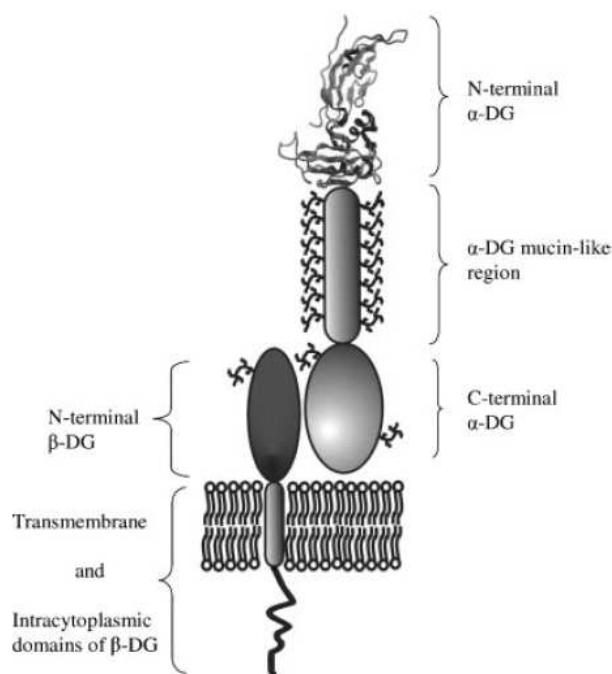


Figure 16 : Schéma des domaines du dystroglycane (DG). L' α -dystroglycane (α -DG) et le β -dystroglycane (β -DG) sont très glycosylés. Le complexe du DG est formé via une interaction non-covalente entre le domaine C-terminal de l' α -DG et l'ectodomaine du β -DG. Le domaine cytoplasmique du β -DG contient dans sa partie C-terminale un site de liaison à la dystrophine (Sgambato et al., 2005).

En plus de son rôle structural, le dystroglycane pourrait prendre part à des voies de signalisation, d'autant plus que son rôle structural n'est pas rempli uniquement par sa capacité de pontage. En effet, le dystroglycane régule la distribution de la cavéolin-3 dans les tissus épithéliaux et par conséquent celle du récepteur α -intégrin-7. Ainsi, le dystroglycane pourrait réguler l'adhésion cellulaire via des voies intégrines-dépendantes (Brennan et al., 2004).

Le dystroglycane est également impliqué dans des voies de signalisation intracellulaire via son interaction avec la protéine adaptatrice Grb-2. Cette dernière est requise durant l'embryogenèse de la souris, pour la différenciation de cellules endodermales et la formation de l'épiblaste via une voie Ras/Sos-dépendante (Cheng et al., 1998).

Le dystroglycane a d'abord été étudié dans les cellules musculaires dans le cadre du complexe de la dystrophine afin d'éluder son implication dans les dystrophies musculaires (Campbell et al., 1989 ; Ervasti et al., 1990). Toutefois, depuis quelques années sa présence dans des types cellulaires autres que musculaires suggère qu'il ait un rôle important au niveau des cellules épithéliales et neuronales dans le développement, la formation de la membrane basale et dans le maintien de l'intégrité des tissus (Henry et al. 1998). En parallèle à ces études, il a été remarqué que l'expression du dystroglycane varie au niveau de cancers du sein, de la prostate et du colon (Henry et al., 2001). De faibles taux, voire une absence d' α -

dystroglycane sont observées et sont en corrélation avec la progression tumorale, de hauts taux de prolifération et de faibles taux de survie des patients. Ces observations s'expliqueraient par le fait que les cellules tumorales perdraient leur attachement à la MEC et deviendraient ainsi plus envahissante et plus facilement métastatiques (Sgambato et al., 2005). Cependant, l'implication du dystroglycane dans l'évolution tumorale ne semble pas n'être due qu'à une perte de liens structuraux. En effet, des événements plus complexes impliquant des voies de signalisation pourraient également intervenir, sachant que, dans des cellules tumorales mammaliennes, l' α -dystroglycane interagit avec hAG-2 et hAG-3, deux protéines sécrétées par les cellules et impliquées dans la différenciation cellulaire, (Fletcher et al. 2003). De plus, il a été démontré que le manque de dystroglycane entraîne la perte de la polarisation et de l'induction de la β -caséine dans les cellules épithéliales mammaires (Muschler et al., 2002 ; Lynn Weir et al., 2006).

Objectifs du mémoire

Il est avéré que le cancer est une maladie génétique causée par des accumulations de mutations somatiques dans les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Toutefois, seule une faible partie de ces gènes ont été analysés et un grand nombre d'altérations impliquées dans le développement des tumeurs est probablement encore inconnu. Dans le passé, la recherche de mutations impliquées dans le cancer a été guidée par des informations provenant d'études de familles enclines aux cancers, par l'identification d'anomalies chromosomiques dans les tumeurs, ou encore par la connaissance de la fonction des protéines spécifiées par ces gènes. De nos jours, les méthodes de la biologie moléculaire et de la protéomique à haut débit permettent de découvrir, d'une manière non biaisée, de nouveaux gènes qui contribuent à la tumorigenèse.

C'est dans cette perspective que Sjöblom et al. (2007) ont développé une stratégie de recherche de mutations dans des tumeurs humaines à l'échelle du génome (figure 17). Leur analyse se porta sur les deux types de cancers les plus communs, c'est-à-dire, les cancers colorectaux et les cancers du sein qui, à eux deux, constituent 20% des cas de cancers diagnostiqués dans le monde. Leur stratégie consista à séquencer les 14.661 gènes qui composent le « consensus coding sequences » (CCDS) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/>), afin d'analyser le génome de 11 lignées cellulaires ou xénogreffes des deux types de tumeurs. A partir des 465 Mb de séquences de tumeurs obtenues ainsi, Sjöblom et al. ont pu identifier 816.986 mutations potentielles dont la très grande majorité purent être écartées car elles n'étaient que des mutations silencieuses, de simples polymorphismes, ou ne purent être confirmées après inspection visuelle des chromatogramme d'analyse de séquences. Une autre partie de ces mutations ont été éliminées car elles n'ont pu être confirmées ou à cause de leur présence dans le génome des cellules normales des patients considérés. Par cette méthode, 1.672 gènes ont été identifiés comme ayant une ou plusieurs mutations dans des cellules tumorales. Ensuite, la détermination d'un « cancer mutation prevalence score » (CaMP), reflétant la probabilité que le nombre de mutations observées dans un gène donné ait une fréquence de mutation plus importante que la fréquence de mutation obtenue par hasard dans ce gène, a permis d'identifier 189 gènes CAN (« candidate cancer genes »). L'un de ces gènes CAN est *MAGEE1* dont deux mutations

ponctuelles, c.2126 A>T (p.Y640F) et c.2198 C>A (p.T664N), ont été identifiées dans des cellules de cancers du sein de deux patientes (tableau 1).

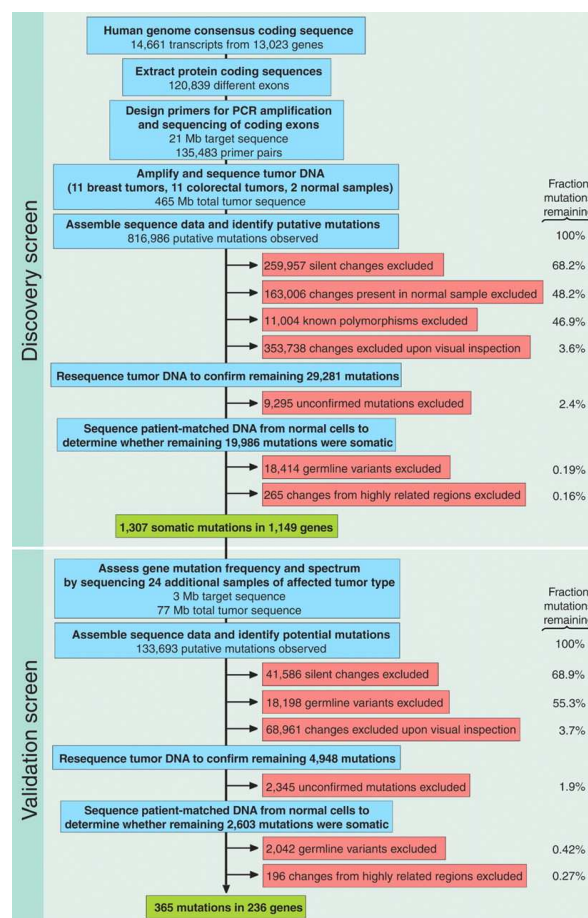


Figure 17 : Schéma de la stratégie d'identification des mutations impliquées dans le processus tumorigénique (Sjöblom et al., 2007).

Gène	CCDS accession	Nom du gène	Chromosome	Score CaMP	Nombre de mutations
<i>MAGEE1</i>	CCDS14433.1	Melanoma AntiGEn E1	Xq13.3	1.46	2 mis-sens

Tableau 1 : Caractéristiques des mutations du gène *MAGEE1* découvertes par Sjöblom et al., 2006.

Mon mémoire a pour but de construire les premiers outils nécessaires à l'étude fonctionnelle de *MAGEE1* et à analyser les effets sur cette fonction des mutations identifiées par Sjöblom et al. Ces outils sont des vecteurs plasmidiques permettant de diriger l'expression de *MAGEE1* dans des cellules de mammifères transfectées. Ils nous permettront d'analyser l'effet de l'expression ectopique de la protéine *MAGEE1* (sauvage et mutante) sur la prolifération et la survie cellulaire via un « colony formation assay » et un « foci formation assay ». Comme au laboratoire nous ne disposons pas d'anticorps anti-*MAGEE1*, une étiquette antigénique (TAG Xpress) a été ajoutée du côté N-terminal de *MAGEE1* pour permettre la détection de la protéine grâce à un anticorps reconnaissant cette étiquette.

Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. Solutions

- Tampon de lyse NP-40 : 50 mM Tris-HCl pH7,5 + 150 mM NaCl + 1 % NP 40 et porter à 200mL avec de l'eau MQ
- PBS :
- Lait 5% : 2.5g de lait en poudre + 50mL de PBST
- PBST : 100ml PBS 10X + 500μL de tween20 et porter à 1L avec de l'eau MQ
- GTE : 50mM glucose + 25mM Tris HCl pH8 + 10mM EDTA
- KAc/HAc : 6ml Kac 5M + 1,15ml HA + 2,25ml eau
- NaOH/SDS : 200μl NaOH 10N + 1ml SDS 10% + eau jusqu'à 10ml
- SB 2x : 100mM de Tris-HCl pH 6.8 + 200mM de DTT + 4% de SDS + 0.2% de BPB + 20% de glycérol
- TAE : 2M de Tris-HCl + 0.05 mM d'EDTA + 1M d'acide acétique
- TE : 10.0 mM de Tris-HCl + 1mM d'EDTA
- Tampon Laemmli : 30g de Tris-base + 144g de glycine + 100mL de SDS 10% et ajouter de l'eau MQ pour atteindre un volume final d'1L
- Anode I : 30mM de Tris-Base + 10% de méthanol
- Anode II : 300mM de Tris-Base + 10% de méthanol
- Cathode I : 25mM de Tris-Base + 10% de méthanol + 40mM d'acide aminoheptane + 0.01% de SDS

I.2. Plasmides

- pcMV6-XL5-E1 : plasmide construit par « TrueClone » qui a inséré le cDNA de *MAGEE1* humain dans pcMV6-XL5. Ce vecteur nous a servi de base de travail afin de construire une version de *MAGEE1* taguée avec l'épitope Xpress. De plus, grâce à son promoteur T7, il a été utilisé pour une transcription/traduction in vitro de *MAGEE1* afin d'évaluer la taille de la protéine MAGEE1.
- pcDNA 3.1 HisC : ce vecteur a été utilisé afin de créer une forme taguée du gène *MAGEE1* avec l'épitope Xpress (figure 18). Son promoteur T7 a permis de réaliser une transcription/traduction in vitro du gène *MAGEE1* inséré dans le vecteur.

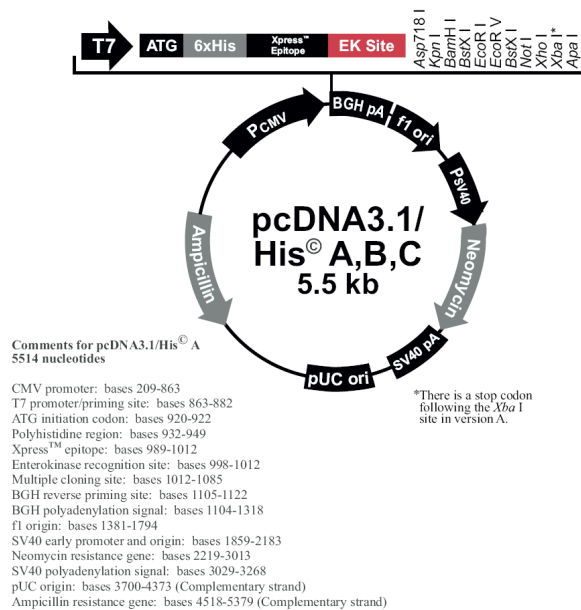


Figure 18 : carte du vecteur pcDNA 3.1 HisC.

- pCRII : afin d'insérer MAGEE1a, fragment du gène MAGEE1 (du nucléotide 211 au nucléotide 1138), dans pcDNA 3.1 HisC, MAGEE1a a été introduit dans pCRII (figure 19) via la technique du TA cloning.

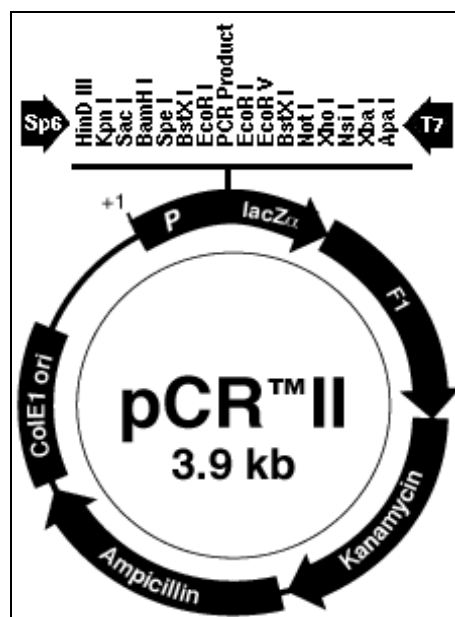


Figure 19 : Carte du vecteur pCRII

- pT7-LUC : ce plasmide est fourni par Promega dans son kit de transcription/traduction in vitro, TnT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems, afin de servir de contrôle positif à la réaction (figure 20).

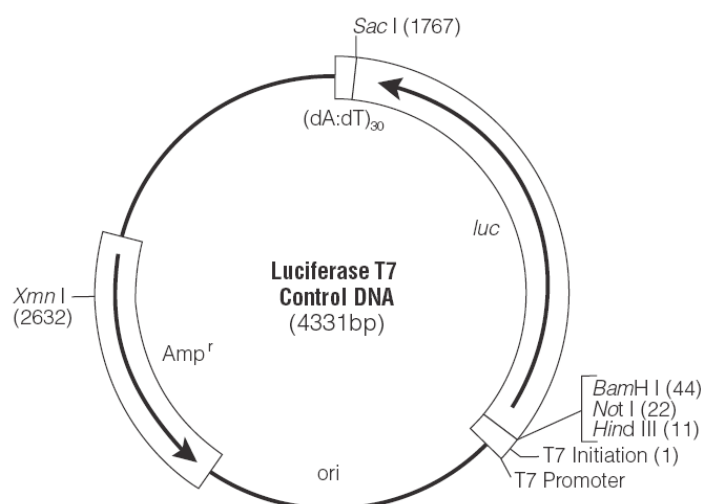


Figure 20 : Carte du vecteur pT7-LUC. Les gènes du plasmide sont représentés par des flèches dans des rectangles.

I.3. Oligonucléotides

I.3.1. Séquençage de *MAGEE1*

Oligonucléotides	Séquence 5' en 3'
E1-44-S	5' TCA GCT TCA GCA GTT GCT TG 3'
E1-454-S	5' ACC ATC TCT GAG GCC TCA A 3'
E1-783-S	5' TGA TGA GGG ACC AAG CAC CT 3'
E1-1216-S	5' ACT GAG GAG TTG AGC ACC T 3'
E1-1461-AS	5' TCC GGT CCA CAG AG CAC TA 3'
E1-1571-S	5' GCC CTA TAG AAT TCG AGG TC 3'
E1-1951-S	5' GGC CTC CTG ATG ATG ATT CT 3'
E1-2279-S	5' TGG AAG AAG ATG CTG CCA GA 3'
E1-2661-S	5' GGA GAT GGA AGA ACC TGA GG 3'
E1-3021-S	5' AGA TGA GGC CAA TAG AGC TG 3'
E1-3281-S	5' GAT TGA CCA CTT GCT GTC TC 3'
BGH-AS	5' TAG AAG GCA CAG TCG AGG 3'

I.3.2. Synthèse de *MAGEE1a*

Oligonucléotides	Séquence 5' en 3' + sites de restriction XhoI (rouge)
XhoE1-met (S)	5' TCA CTC CAG TCT CTG GTA AGC CAG AAT TCG CGC 3'
XhoE1-1138 (AS)	5' ATA ACT CGA GTG CTC GAT CCC TCA CCA GCA GT 3'

I.2.3. Mutagenèse de pcDNA 3.1 HisC-E1

Oligonucléotides	Séquence 5' en 3' + nucléotides mutés (rouge)
E1*-2126 A/T (AS - S)	5' ACT GGC CTG AAG TCT AAG T 3'
E1*-2198 C/A (AS - S)	5' TCA TCT TG T TGG TTT CTA GG 3'
E1-BamHI-2680-AS	5' GAC TGG ATC CGT TTG GAC TGT CTA CGA TCT 3'
E1-1951-S	5' GGC CTC CTG ATG ATG ATT CT 3'

II. Méthodes

II.1. Techniques relatives à l'utilisation d'ADN

II. 1.1 Transformation d'Escherichia coli par choc électrique

- Dans un tube de bactéries DH5 α électrocompétentes, ajouter 5 μ L de produit de ligation
- Mélanger doucement
- Transférer les bactéries dans une cuvette à électroporation préalablement refroidie dans la glace
- Provoquer un choc électrique court et intense, 5msec à 2300V
- Ajouter rapidement 300 μ L de milieu LB liquide
- Transférer le tout dans un tube Eppendorf
- Incuber 1h à 37°C et étaler les bactéries sur deux boîtes contenant un milieu sélectif approprié et laisser pousser O/N à 37°C

II.1.2. Culture bactérienne

- Dans un falcon stérile, ajouter 5 mL de LB et 5 μ L d'ampicilline 100 mg/mL (Roche)
- Ensemencer ce milieu avec une colonie isolée de bactéries
- Incuber O/N, sans agitation, à 37°C

II.1.3. Préparation d'ADN plasmidique par lyse alcaline

- Ensemencer les bactéries dans 5 ml de LB + antibiotique et incuber O/N à 37°C
- Centrifuger 10 minutes à 2 500 rpm afin de culoter les bactéries
- Décanter et resuspendre les bactéries dans 300 μ L de GTE+RNAse
- Vortexer et laisser 10 minutes à RT
- Ajouter 450 μ L de NaOH/SDS qui lyse les bactéries
- Retourner plusieurs fois le tube et laisser 10 minutes à 4°C

- Ajouter 360 µL de KAc/HA qui précipite l'ADN chromosomique et mélanger
- Centrifuger 10 minutes à 14 000 rpm pour éliminer le précipité
- Reprendre le surnageant et y ajouter un volume de phénol-CiAA
- Vortexer et centrifuger 15 minutes à 14 000 rpm
- Reprendre la phase aqueuse et y ajouter 1 volume de chloroforme
- Vortexer et centrifuger 15 minutes à 14 000 rpm
- Reprendre la phase aqueuse
- Ajouter 2 volumes d'éthanol 100% et laisser 10 minutes à température ambiante
- Centrifuger 15 minutes à 14 000 rpm et décanter
- Ajouter 200 µL d'éthanol 70% pour rincer le culot
- Décanter et laisser sécher le culot
- Reprendre le culot dans du TE ou de l'eau MilliQ

II.1.4. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction du poids moléculaire. Le pourcentage d'agarose est inversement proportionnel au poids moléculaire (PM) des fragments à séparer. Du Bromure d'Ethidium (BrEth), un agent intercalant et fluorescent doit être ajouté à l'agarose. Le PM des fragments est estimé par co-migration des fragments d'ADN de PM connu, appelés marqueurs de Poids Moléculaire. Nous utilisons les marqueurs de PM 1kb et 100bp (Invitrogen). L'ADN déposé sur le gel peut être visualisé sous UV.

II.1.4.1. Les échantillons

Dans 1 Eppendorf, ajouter 2 µL d'ADN + 8µL de TE [1x] + 2 µL de tampon de chargement [6x].

II.1.4.2. Marqueur de Poids Moléculaire pour ADN

Dans 1 Eppendorf, ajouter 0,5 µL de « 1 Kb DNA ladder » 1 µg/µL (Invitrogen), 9,5 µL de TE 1x et 2 µL de tampon de chargement [6x].

II. 1.4.3. Préparation du gel

- Le gel d'agarose (0,4% → 1%) est coulé dans la cuve à électrophorèse contenant un peigne
- laisser le gel se solidifier
- retirer le peigne
- déposer les échantillons dans les puits ainsi que le marqueur de PM
- remplir la cuve de TAE 1x de façon à immerger le gel
- Faire migrer l'ADN par électrophorèse
- Lorsque les bandes d'ADN ont bien migré, prendre une photo sous UV

II.1.5. Restrictions sur plasmide

Dans un tube Eppendorf et dans la glace, ajouter :

- 5 µL de tampon 10x correspondant à l'enzyme
- 1 unité d'enzyme de restriction par µg d'ADN de plasmide
- X µL de plasmide

- Porter à un volume final de 50 µl avec de l'eau distillée
- Incuber 2 heures à 37°C

II.1.6. Ligation d'un plasmide

Ajouter le vecteur et l'insert dans un rapport moléculaire (1 :3) à :

- 2µL de tampon T4 DNA ligase 10x (NEB)
- 1µL de DNA T4 ligase (NEB)
- Porter à 20µL avec de l'eau
- Incuber à 16°C O/N

II.1.7. Purification de l'ADN sur colonne (Kit Promega Wizzard ® SV Gel and PCR Clean-Up System

Le Wizzard ® SV Gel and PCR Clean-Up System permet la purification de fragments d'ADN simple ou double brin. Le principe de ce kit est basé sur la liaison sélective de l'ADN sur une membrane de silice en condition fortement salée. Les contaminants ne sont pas retenus sur la membrane et sont éliminés par lavage. L'ADN est élué en condition de faible salinité.

II.1.7.1. Purification d'ADN à partir du gel d'agarose

- Exciser le fragment de gel d'agarose contenant la bande d'ADN d'intérêt à l'aide d'un scalpel et mettre dans un tube de 1,5mL
- Dans un tube eppendorf, ajouter un volume de « membrane binding solution » (guanidine isocyanate) équivalent au poids du gel à purifier
- Vortexer et incuber 10 minutes à 55°C
- Vortexer à nouveau

II.1.7.2. Purification de l'ADN

- Placer une mini colonne SV dans un tube collecteur
- Transférer le gel dissout sur une minicolonne SV et incuber une minute à température ambiante
- Centrifuger 1 minute la minicolonne à 10 000 rpm
- Vider le tube collecteur
- Laver la colonne au moyen de 700µL de « membrane wash solution » dilué avec de l'éthanol 95%
- Centrifuger une minute à 10 000 rpm
- Vider le tube collecteur
- Relaver la membrane par 500µL de « membrane wash solution »
- Centrifuger 5 minutes à 10 000 rpm
- Vider le tube collecteur
- Centrifuger une minute la colonne
- Ajouter 20µL de nucléase free water à la colonne

- Laisser une minute à température ambiante puis centrifuger une minute à 10 000 rpm
- L'ADN purifié peut être conservé au réfrigérateur

II.1.8. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette technique permet l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN d'intérêt. Les séquences bordant le fragment à amplifier doivent être connues pour concevoir des amorces oligonucléotidiques (primers). La PCR se déroule en plusieurs étapes, la matrice d'ADN est d'abord dénaturée par chauffage en présence d'un excès d'oligonucléotides et de dNTP's. Afin de permettre l'hybridation spécifique des amorces, le mix est ensuite soumis à une diminution de température dépendant de la « température de melting » des amorces. La Taq DNA polymérase de Promega (gotaq), une ADN polymérase thermorésistante, amplifie la séquence comprise entre les amorces. Ce cycle de dénaturation/Hybridation/élongation est répété 30 fois.

Réactifs	Quantité pour 20µl
Tampon Taq DNA polymérase 5x	4µL
Mix dNTP's (2mM)	2µL
Primer sens (10µM)	2µL
Primer antisens (10µM)	2µL
Taq DNA polymérase	0.1µL
Template	30ng
Eau milli Q	Ajuster pour 20µL de volume total

Programme :

- Dénaturation de 5 minutes à 94°C
- Trente cycles d'amplification divisés en trois étapes :
 1. Trente secondes à 94°C pour dénaturer
 2. Trente secondes à X°C pour hybrider où $X = T_m - 5^\circ\text{C}$
 3. Y minute(s) à 72°C pour l'élongation où Y= la taille (Kb) du fragment à amplifier
- Elongation finale de 10 minutes à 72°C

La température de melting (TM) des amorces se calcule par la formule $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. Ce calcul ne prend en compte que la partie s'hybridant au premier cycle de dénaturation.

L'ADN génomique peut être remplacé par une culture bactérienne (PCR sur colonies) sans extraction d'ADN. Les bactéries sont alors lysées lors de la première étape de dénaturation à 94°C.

II.1.9. Transcription/traduction in vitro (Kit Promega TnT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems)

Le TnT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems est un kit de transcription/traduction d'ADN circulaire ou linéaire (produit PCR). Cette technique se base sur la reconnaissance d'un promoteur T7, T3 ou SP6 par une ARN polymérase T7, T3 ou SP6, respectivement. Le lysat de réticulocytes de lapin, contenant tous les composants macromoléculaires (ribosomes, ARNts, aminoacyl-ARNt synthetases, facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison, etc.) nécessaires à la transcription/traduction, permet de générer la protéine recherchée.

II.1.9.1. Protocol pour la réaction de transcription/traduction

- Placer dans un tube d'1.5mL ou de 0.5mL :
 - 25µL de lysat de réticulocytes de lapin
 - 2µL de tampon de réaction TnT®
 - 1µL de T7 ARN polymérase
 - 1µL de mix d'acides sans méthionine
 - 2µL de [³⁵S]méthionine (>1kCi/mmol)
 - 1µL de RNAsin® Ribonuclease inhibitor
 - 1µg d'ADN template
 - Ajouter de la Nuclease-Free Water pour atteindre un volume final de 50µL
- Placer ce tube à 30°C pendant 90 minutes

II.1.9.2. Analyse de la réaction par électrophorèse dénaturante (SDS-polyacrylamide)

- Préparation d'un gel SDS-polyacrylamide 8% d'une épaisseur de 0.75mm (cfr point II.2.2.1)
- Préparation des échantillons au chargement:
 - 3µL du mix de réaction
 - 2µL de PBS 1x
 - 5µL de SB 2x
- Faire bouillir les échantillons dans un bain marie durant 3 minutes, les charger et faire migrer à 100V
- Placer le gel dans une solution de fixation composée à 50% de méthanol et à 10% d'acide acétique durant 30 minutes avec agitation
- Placer le gel fixé dans une solution Amplify durant 20 minutes avec agitation
- Sécher la membrane sur une feuille de papier Watman durant 45 minutes à 80°C dans un sécheur de gel (« gel dryer model 583 » de BioRad)
- Placer le gel séché dans une cassette avec un film Kodak BioMax MS et laisser exposer O.N.
- Développer le film.

II.1.10. TA cloning

La technique du TA cloning permet d'insérer un produit PCR amplifié par la Taq polymérase de façon très efficace et très simple. Elle se base sur les queues poly-A du produit PCR qui permettent au vecteur pCRII, linéarisé et contenant des extrémités poly-T, d'opérer une ligation avec le produit PCR. Cette ligation interrompt l'ORF du gène LacZ de pCRII et permet, après sa transfection dans des bactéries électrocompétentes, de détecter les bactéries ayant incorporé le plasmide pCRII-Insert. En effet, si les bactéries croissent sur un milieu LB + ampiciline (LBA) recouvert de X-gal et d'IPTG, les colonies des bactéries qui ont incorporé le plasmide pCRII-Insert seront « blanches » tandis que celles qui n'ont pas incorporé pCRII-Insert seront « bleues ». Cette technique permet ainsi une détection aisée des transformants.

II.1.10.1. Ligation

Du produit frais de la PCR doit être utilisé pour la ligation car les queues poly-A risquent d'être réduites au cours du temps.

- Dans un eppendorf déposer le mix de ligation comme suit :
 - 1µL du produit PCR
 - 1µL de tampon de la ligase
 - 2µL de pCRII
 - 1µL de ligase
 - 5µL d'eau MQ
- Placer le mix de ligation à 14°C O.N.

II.1.10.2. Electroporation et étalement de la ligation

- Dans un tube de bactéries DH5α électrocompétentes, ajouter 2 µL de produit de ligation
- Mélanger doucement
- Transférer les bactéries dans une cuvette à électroporation préalablement refroidie dans la glace
- Provoquer un choc électrique court et intense, 5msec à 2300V
- Ajouter rapidement 300 µL de milieu LB liquide
- Transférer le tout dans un tube Eppendorff
- Incuber 1h à 37°C
- Étaler les bactéries sur deux boîtes de pétri contenant un milieu sélectif approprié (LBA) et recouvert du mix de coloration (40µL de X-gal et 10µL d'IPTG). Laisser pousser O/N à 37°C

II.1.11. Déphosphorylation d'ADN par la « shrimp alcalin phosphatase »

Placer dans le tube contenant l'ADN à déphosphoryler 1µL de « shrimp alcalin phosphatase » (SAP), laisser 1h à 37°C et inactiver ensuite l'enzyme en chauffant le tube à 65°C durant 10 minutes.

II.2. Techniques relatives à l'utilisation de cellules eucaryotiques

II.2.1. Transfection cellulaire au moyen de l' « ExGen 500 »

II.2.1.1. Préparation des cellules

Le jour avant la transfection :

- Aspirer le milieu de la T75 contenant les cellules (293T), rincer avec 5 ml de PBS, ajouter 3mL de trypsine EDTA, incuber quelques minutes à 37° C et ajouter 7 mL de DMEM+FBS+P/S+Gentamycine
- Compter les cellules au moyen d'une cellule de Bürker. Ensemencer les cellules à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules/puit, dans une plaque 6 puits, de façon à ce que les cellules atteignent 50 à 70% de confluence le jour de la transfection

II.2.1.2. Transfection

Le jour de la transfection :

- Aspirer le milieu de chaque puit et verser 2mL de DMEM+FBS+P/S+Gentamycine dans chaque puit
- Préparer les mix de transfection dans un eppendorf : déposer 200µL de NaCl 150mM et 3µg d'ADN puis vortexer quelques secondes. Ajouter 10µL d'Exgen 500, vortexer 10 secondes et laisser 10 minutes à RT.
- Déposer gouttes à gouttes les mix de transfection dans les puits
- Placer la plaque 6-puits dans un incubateur durant 24h à 37°C et 5% de CO₂

II.2.2. Western blot sur lysat

II.2.2.1. Lyse des cellules

- Aspirer le milieu des cellules, ajouter 300µl de tampon de lyse NP40 + complete. Laisser 10 minutes à RT
- Récupérer les 300µL de lysat dans un Eppendorf et centrifuger 10 min à 14000 rpm. Récupérer le surnageant

II.2.2.1. Western blot

- Préparer un gel 6% d'acrylamide :
 - Préparation du gel de séparation 6% :
 - 1.5mL d'acrylamide

- 5.85mL d'eau MQ
 - 2.5mL de Tris-HCl pH 8.8
 - 0.1mL de SDS 10%
 - 0.1mL d'APS 10%
 - 0.01mL de TEMED
 - Couler le gel dans le dispositif (Bio-Rad) et laisser polymériser durant 45 minutes après avoir déposé un peu d'éthanol au dessus du gel
 - Préparer le gel d'empilement :
 - 0.3mL d'acrylamide
 - 1.9mL d'eau MQ
 - 0.75mL de Tris-HCl 1M
 - 0.03mL de SDS 10%
 - 0.03mL d'APS 10%
 - 0.003mL de TEMED
 - Après la polymérisation du gel de séparation couler le gel d'empilement et ajouter le peigne qui permettra de former les puits.
 - Laisser polymériser 20 à 30 minutes
 - Retirer les plaques du mécanisme et laver les puits avec du tampon Laemmli pour éliminer le gel mou.
-
- Ajouter 4µl de SDS loading buffer 5X à 16µl de lysat. Bouillir 5 min
 - Charger 16µl dans un gel 6% d'acrylamide. Faire migrer à 100V
 - Pour chaque gel, tremper la membrane PVDF (Hybond-p de Amersham BIOSCIENCES) dans du méthanol pendant 1 min.
 - La rincer plusieurs fois dans l'eau puis dans la solution "Anode I".
 - Venir la mettre sur le gel.
 - Tremper 3 papiers Watman dans la solution "Anode I". Les mettre sur la membrane.
 - Tremper 3 papiers Watman dans la solution "Anode II". Les mettre sur les 3 papiers Watman tremper dans la solution « Anode I ».
 - Retourner le montage et tremper 3 papiers Watman dans la solution "Cathode". Les mettre sur le gel.
 - Mettre le montage avec les papiers "Cathode" vers le haut dans l'appareil. Fermer le tout et brancher l'appareil sur 225mA pendant 1h.
 - Bloquer les membranes dans du lait 5% pendant 10 minutes.
 - Incuber ON avec 5ml d'anticorps primaire (anti-Xpress) dilué 5000X dans du lait 5% pendant 2h
 - Laver 3x 10 minutes dans du PBST.
 - Incuber 1h avec 5ml d'anticorps secondaire dilué 1000X dans du lait 5%.
 - Laver 3x 10 minutes dans du PBST
 - Révéler les membranes pendant 5 min dans 4 ml de substrat de la HRP (kit SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate, Pierce)
 - Exposer les membranes avec un film ECL pendant 5 minutes

Résultats

I. Constrution du plasmide permettant l'expression de MAGEE1 « étiqueté » avec l'épitope Xpress

Au cours de ce mémoire, nous avons construit 3 vecteurs permettant l'expression de 3 variants de MAGEE1 étiqueté avec l'épitope Xpress : la forme sauvage et les deux formes mutées identifiées par Sjöblom et al. (2006). La stratégie élaborée comporte deux étapes. La première consiste en l'insertion de *MAGEE1* dans pcDNA 3.1 HisC. La seconde étape consiste en une mutagenèse dirigée par PCR afin d'introduire dans MAGEE1 les deux mutations ponctuelles identifiées dans des tumeurs du sein (c.2126 T>A et c.2198 C>A). La stratégie élaborée pour réaliser la première étape consiste en premier lieu à générer par PCR un fragment d'environ 1kb commençant juste après l'ATG de *MAGEE1*. Ce fragment, appelé MAGEE1a, a été inséré dans pcDNA 3.1 HisC afin de placer l'ORF de *MAGEE1* en phase avec l'ATG de l'épitope Xpress. Ensuite, afin de ne pas générer de mutation non désirées dans le gène de *MAGEE1*, l'ORF de *MAGEE1* a été reconstituée dans pcDNA 3.1 HisC par l'insertion d'un fragment de restriction de 2.3kb, appelé MAGEE1b. Ces étapes sont schématisées sur les figures 21 et 22 et décrites en détails dans les points A, B, C et D ci-dessous.

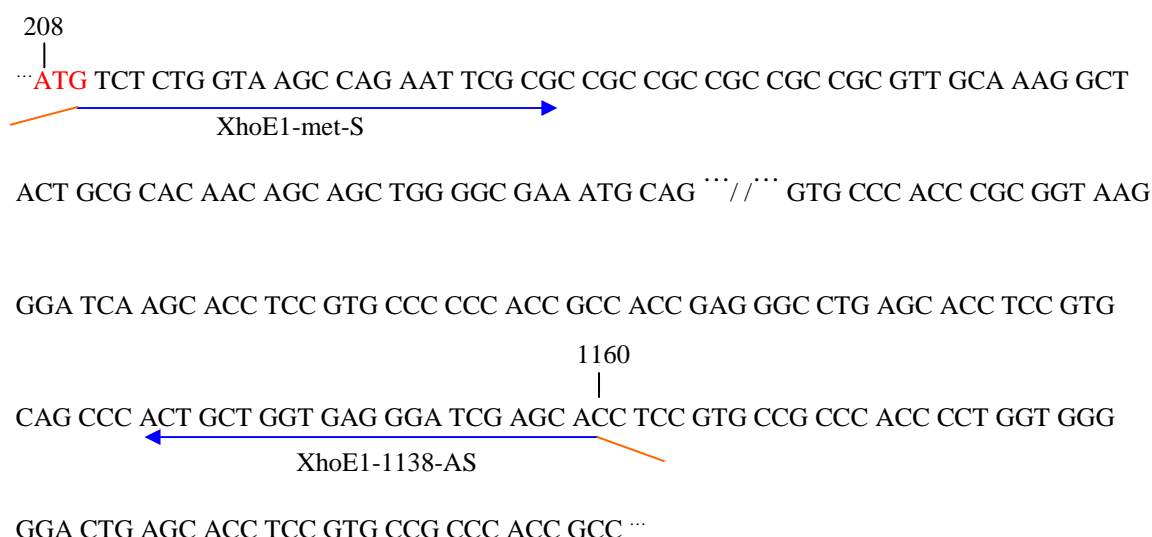
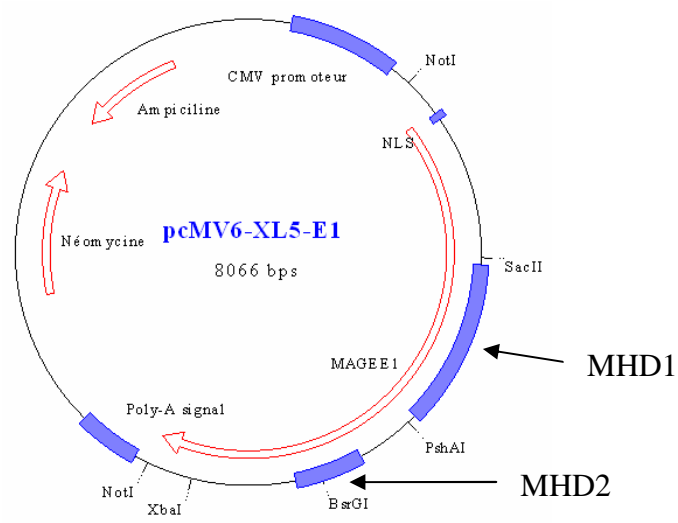
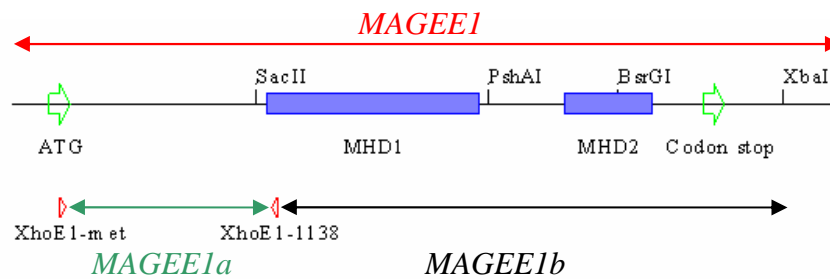
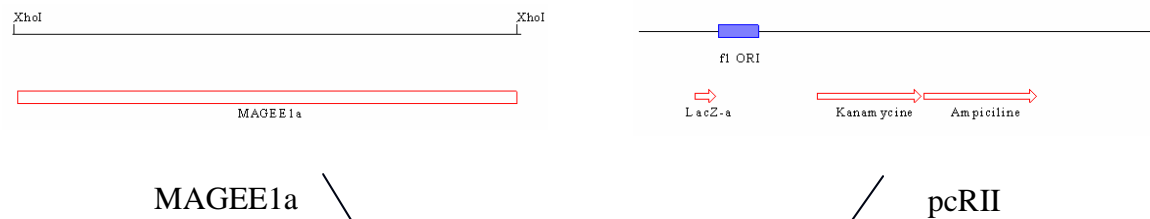


Figure 21 : Représentation des oligonucléotides XhoE1-met-S et XhoE1-1138-AS en correspondance avec la séquence de MAGEE1 qui leur est complémentaire (flèche bleue). Les barres oranges correspondent aux extensions des oligonucléotides XhoE1-1138-AS et XhoE1-met-S contenant des sites XhoI. Le codon de départ de MAGEE1 est représenté en rouge. L'utilisation de ces oligonucléotides dans une PCR, nous a permis de générer MAGEE1a, un fragment 5' de MAGEE1 (211-1160) flanqué de sites de restriction XhoI.



A) PCR avec les oligonucléotides XhoE1-met et XhoE1-1138

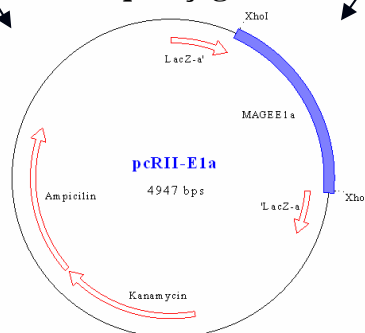




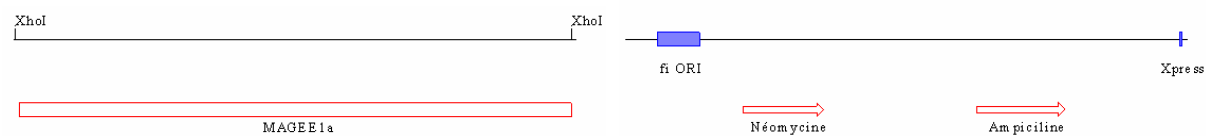
MAGEE1a

pcR11

B) TA cloning et séquençage



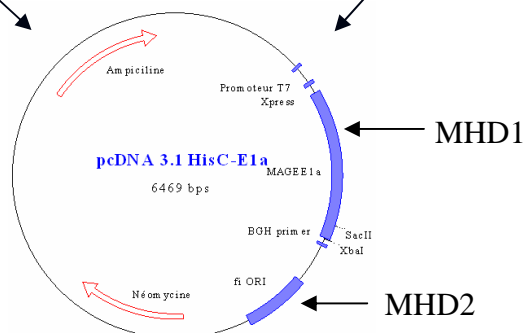
C) Clivage par XhoI

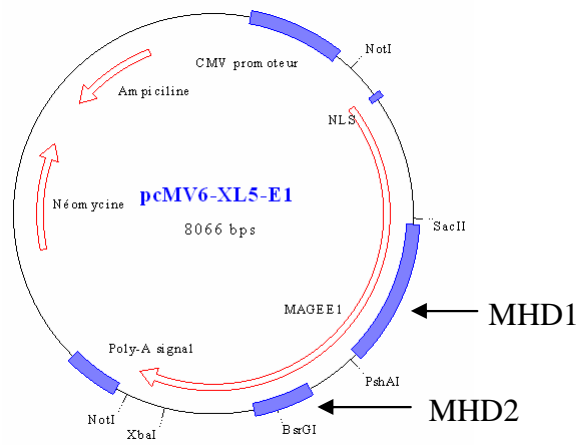


MAGEE1a

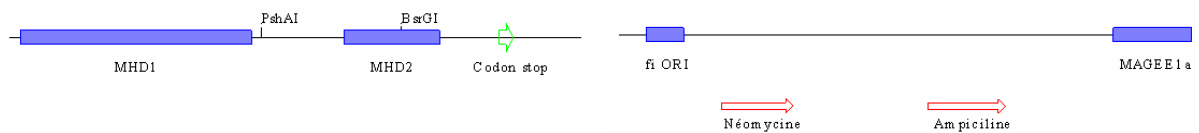
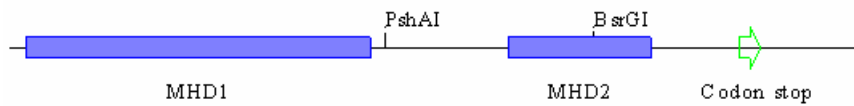
pcDNA 3.1 HisC clivé par XhoI

C) Ligation





D) Restriction par SacII et XbaI → *MAGEE1b*



MAGEE1b extrait de pcMV6-XL5-E1 par restriction avec SacII et XbaI

pcDNA 3.1 HisC-E1a clivé par SacII et XbaI

D) Ligation et séquençage

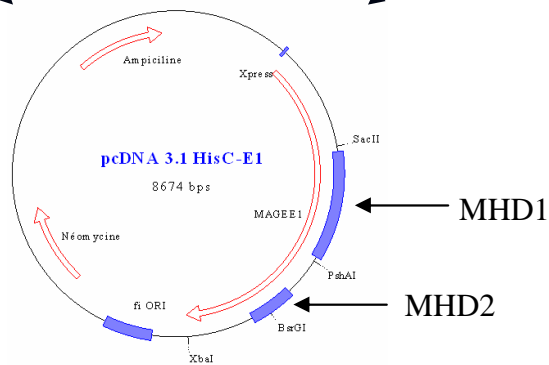


Figure 22 Schéma récapitulatif des différentes étapes de la construction du vecteur pcDNA 3.1 HisC-E1 permettant l'expression de *MAGEE1* étiquetée avec l'épitope Xpress. Les gènes portés par les vecteurs sont symbolisés par des flèches rouges. Les régions fonctionnelles sont représentées par des rectangles bleus. Les sites de restrictions sont indiqués par des barres noires suivies de pointillées.

A) Production de MAGEE1a par PCR

Au laboratoire, nous disposons d'un plasmide commercial (pcMV6-XL5-MAGEE1) contenant l'ADNc de *MAGEE1* humain. Ce plasmide a été utilisé comme matrice dans une réaction PCR qui a généré un fragment d'ADN de 949 bp de *MAGEE1* débutant juste après l'ATG et flanqué de sites de restriction XhoI. Les oligonucléotides XhoEI-met et XhoEI-1138 ont été utilisés pour générer ce fragment, appelé MAGEE1a (figure 23).

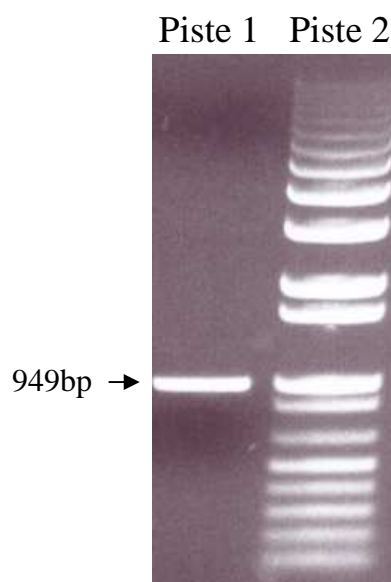


Figure 23: Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose de MAGEE1a généré par PCR avec les oligonucléotides XhoEI-met et XhoEI-1138. L'échelle de poids moléculaire utilisée est le « 1Kb DNA ladder » (Invitrogen) (piste 2).

B) Insertion de MAGEE1a dans pCRII

Par la technique du TA cloning, MAGEE1a a été inséré dans pCRII pour donner pCRII-MAGEE1a qui a servi à électroporer des bactéries DH5 α . L'ADN plasmidique de 4 colonies de transformants (colonies blanches) a été préparé par lyse alcaline et l'insert a été séquencé. La séquence de deux clones (1 et 4) s'est avérée correcte.

C) Insertion de MAGEE1a dans pcDNA 3.1 HisC

Le fragment MAGEE1a a été excisé de pCRII-MAGEE1a.4 par XhoI (figure 24), purifié sur gel d'agarose et ligué avec du pcDNA 3.1 HisC préalablement linéarisé par XhoI (figure 25) et déphosphorylé.

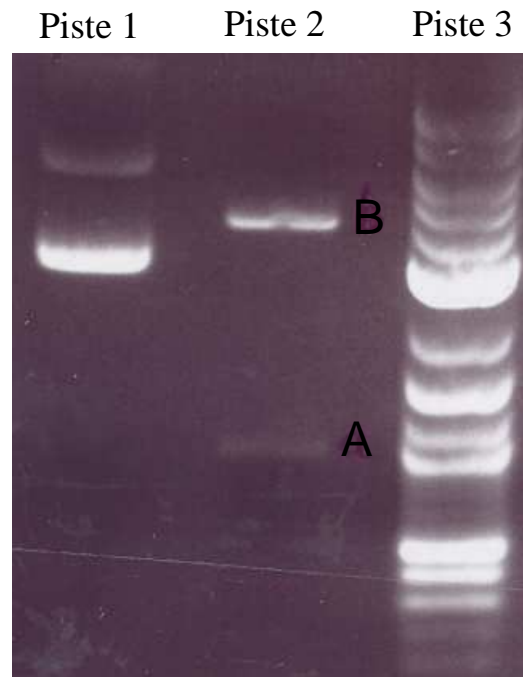


Figure 24: Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose de pCRII-MAGEE1a.4 non clivé (piste 1) et pCRII-MAGEE1a.4 clivé par XhoI (piste 2). B = pCRII (3971bp) et A = MAGEE1a (949bp). L'échelle de poids moléculaire utilisée est le « 2-log ladder » (piste 3)

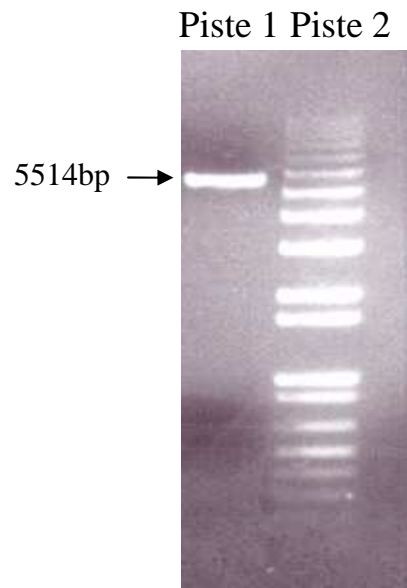


Figure 25: Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose de pcDNA 3.1 HisC clivé par XhoI (piste 1). L'échelle de poids moléculaire utilisées est le « 1Kb DNA ladder » (Invitrogen) (Piste 2).

Le produit de la ligation a servi à électroporer des bactéries DH5 α que nous avons étalées sur du milieu gélosé LB contenant de l'ampiciline (LBA) de manière à sélectionner les transformants. Quarante colonies résistantes à l'ampiciline (Ap^R) ont été analysées par PCR afin de détecter les colonies ayant incorporé le plasmide attendu, pcDNA 3.1 HisC-MAGEE1a. Les oligonucléotides utilisés pour la PCR étaient E1-454-S et BGH-AS qui ont généré pour 8 clones, dont le clone 13 un produit de 759bp recouvrant une partie de MAGEE1a et de pcDNA 3.1 HisC (figure 26).

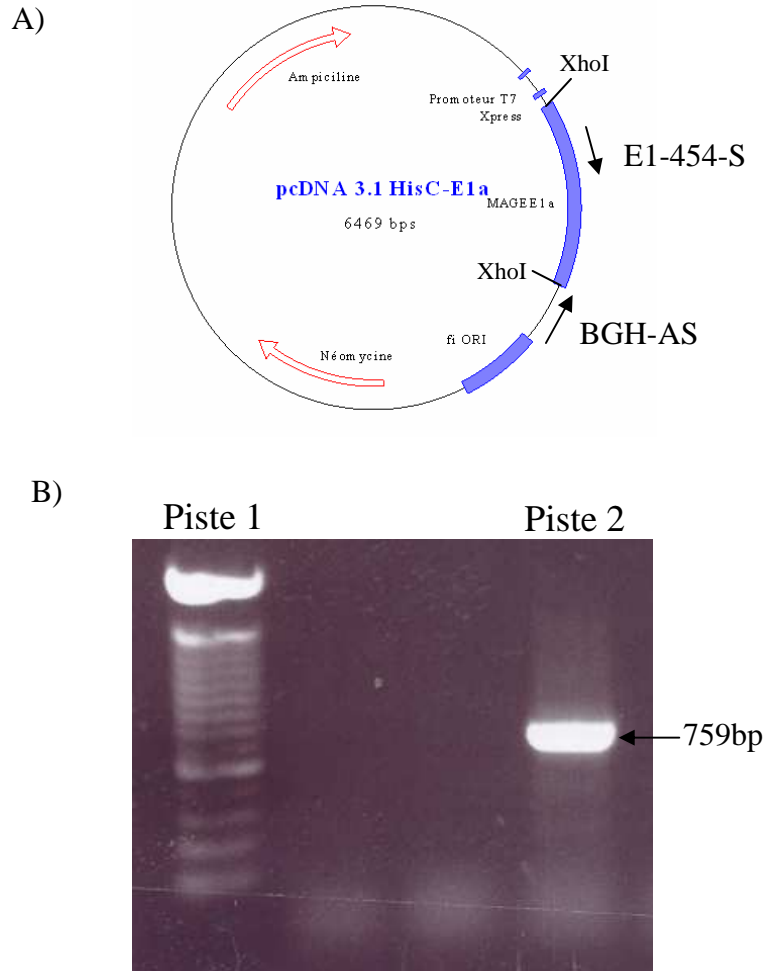


Figure 26: A) Représentation des oligonucléotides BGH-AS et E1-454-S (flèches noires) par rapport à la matrice pcDNA 3.1 HisC-E1a.13 B) Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose du produit PCR réalisé avec les oligonucléotides BGH-AS et E1-454-S montrant la présence de MAGEE1 dans pcDNA 3.1 HisC-MAGEE1a.13 (Piste 2). L'échelle de poids moléculaire utilisée est le « 100Bp DNA ladder » (Invitrogen) (Piste 1).

D) Insertion de MAGEE1b dans pcDNA 3.1 HisC-MAGEE1a.13

pcMV6-XL5-MAGEE1 a été digéré par SacII et XbaI (figure 27) afin de libérer un fragment de 2300bp correspondant à MAGEE1b (partie 3' de l'ORF de *MAGEE1*). Ce fragment a été purifié après électrophorèse en gel d'agarose.

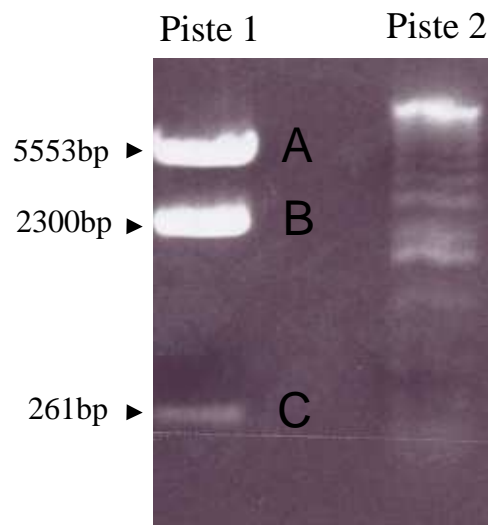


Figure 27: Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose du produit de clivage de *pcMV6-XL5-E1* par *SacII* et *XbaI* (piste 1). A = *pcMV6-XL5* + 1071bp de *MAGEE1* (1-1071) B = *MAGEE1b* C = *MAGEE1* 3367-3628 (partie 3' non traduite). L'échelle de poids moléculaire utilisées est le « 1Kb DNA ladder » (Invitrogen) (piste 2).

MAGEE1b a été ligué avec du *pcDNA 3.1 HisC-E1a.13* digéré par *SacII* et *XbaI* et déphosphorylé. Cette ligation a servi à électroporer des bactéries *DH5α* et les transformants ont été sélectionnés sur des boîtes LBA. Quarante cinq colonies ont été analysées par PCR afin de détecter celles ayant incorporé le plasmide attendu. Dans le but de déceler la présence de l'insert (*MAGEE1b*), les oligonucléotides utilisés pour réaliser la PCR étaient BGH-AS et E1-3021-S. Un produit PCR de taille attendue (403bp) a été observé pour 44 clones dont le clone n°8 (figure 28) qui a été utilisé pour les étapes suivantes de mutagenèse. L'ADN plasmidique de *pcDNA 3.1 HisC-E1.8* a été analysé par restriction *SacII/XbaI* afin de vérifier son intégrité (figure 29). Une autre digestion par *NaeI* a été réalisée pour vérifier l'intégrité du vecteur et elle montre le profil de restriction attendu (données non montrées).

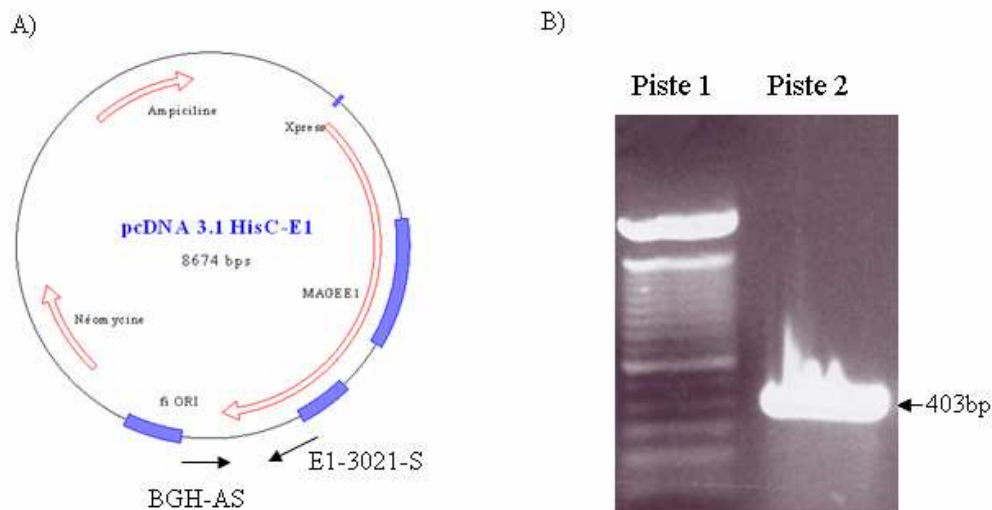


Figure 28: A) Représentation des oligonucléotides BGH-AS et E1-3021-S (flèches noires) par rapport à la matrice pcDNA 3.1 HisC-E1.8 B) Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose du produit de PCR réalisé avec les oligonucléotides BGH-AS et E1-3021-S sur la colonie numéro 8 de bactéries DH5 α électroporées avec la ligation de pcDNA 3.1 HisC-E1a et MAGEE1b (piste 2). L'échelle de poids moléculaire utilisées est le « 100 bp DNA ladder » (Invitrogen) (piste 1)

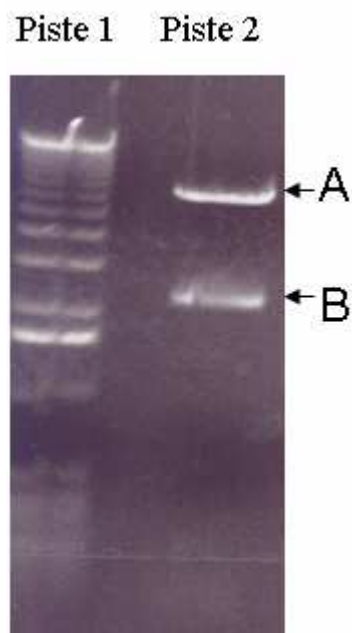


Figure 29 : Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose du produit du clivage de pcDNA 3.1 HisC-E1. 8 par SacII et XbaI (piste 2). A = pcDNA 3.1 HisC-E1a (6.5Kb) ; B = MAGEE1b (2.3kb. L'échelle de poids moléculaire utilisées est le « 1Kb DNA ladder » (Invitrogen) (piste 1).

II. Mutagenèse dirigée de MAGEE1

Nous avons ensuite introduit dans pcDNA 3.1 HisC-E1.8 les deux mutations identifiées par Sjöblom et al. dans des tumeurs du sein (c.2126 T>A et c.2198 C>A). La technique employée a été celle de la mutagenèse dirigée par triple PCR. Le principe de cette technique est schématisé sur la figure 30.

II.1. Production des fragments mutés

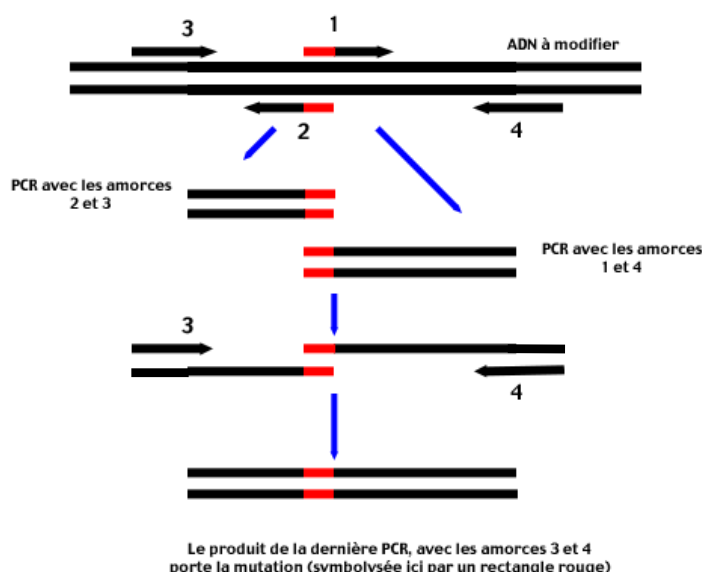


Figure 30: Représentation schématique du principe de la mutagenèse dirigée par PCR.

Nous avons généré par PCR deux fragments de *MAGEE1* contenant chacun une mutation ponctuelle différente, c.2126 A>T et c.2198 C>A. Pour ce faire, une double PCR a été réalisée sur pcDNA 3.1 HisC.8. Dans le cas de la mutation c.2126 A>T, une première PCR, utilisant les oligonucléotides E1-1951-S (l'oligonucléotide n°3 sur la figure 30) et E1*2126 A>T-AS (l'oligonucléotide n°2 sur la figure 30), a généré un fragment de 184bp (figure 31). Pour la deuxième PCR, qui a produit un fragment de 583bp (figure 33), les oligonucléotides utilisés étaient E1 E1BamHI2680-AS (l'oligonucléotide n°4 sur la figure 30) et E1*2126 A>T-S (l'oligonucléotide n°1 sur la figure 30). Ces deux produits PCR ont été mélangés avant d'être purifiés avec le Kit Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Le résultat de la purification, E1*m-2126-mix, a été utilisé comme matrice dans une troisième PCR avec les oligonucléotides E1BamHI-2680-AS et E1-1951-S. Le produit de la PCR a donné un fragment de 749bp (figure 32) qui contient la mutation c.2126 A>T et a été appelé E1*m-2126. Dans le cas de la mutation c.2198 C>A, une première PCR, utilisant les oligonucléotides E1-1951-S et E1*2198 C>A-AS (l'oligonucléotide n°2 sur la figure 30), a généré un fragment de 255bp (figure 33). Pour la deuxième PCR, qui a produit un fragment de 513bp (figure 31), les oligonucléotides utilisés étaient E1BamHI2680-AS et E1*2198 C>A-S (l'oligonucléotide n°1 sur la figure 30). Ces deux produits PCR ont été mélangés

avant d'être purifié avec le Kit Promega Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System. Le résultat de la purification, E1*m-2198-mix, a été utilisé comme matrice pour une troisième PCR avec les oligonucléotides E1BamHI-2680-AS et E1-1951-S. Le produit de la PCR a donné un fragment de 749bp (figure 32) qui contient la mutation c.2198 C>A et a été appelé E1*m-2198.

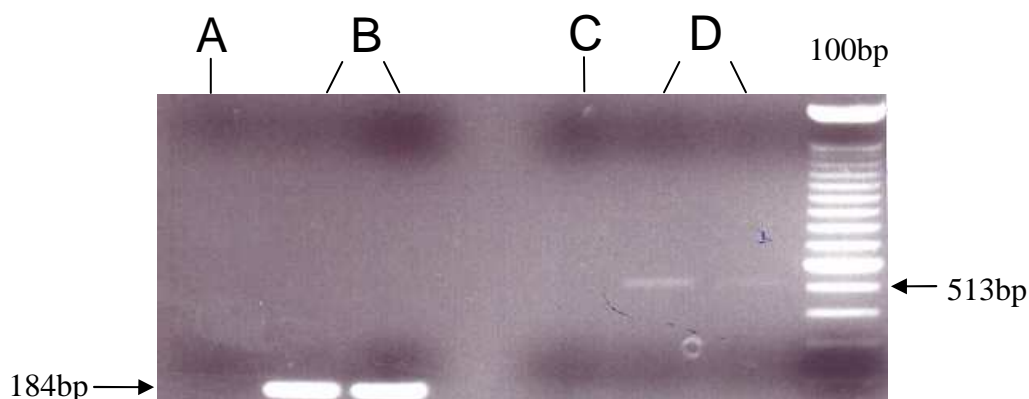


Figure 31 : Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose du produit des PCR utilisant les oligonucléotides E1-1951-S et E1*2126 T>A-AS (B) et les oligonucléotides E1BamHI-2680-AS et E1*2198 C>A-S (D). Le contrôle négatif de chaque PCR est montré dans la piste A et C.

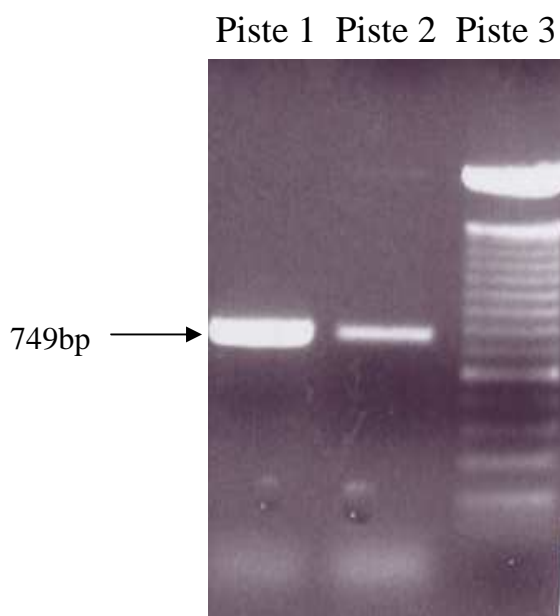


Figure 32: Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose du produit des PCR utilisant les oligonucléotides E1-1951-S et E1BamHI-2680-AS sur les matrices E1*m-2126-mix (piste 1) et E1*m-2198-mix (piste 2) L'échelle de poids moléculaire utilisées est le « 100bp DNA ladder » (Invitrogen) (piste 3).

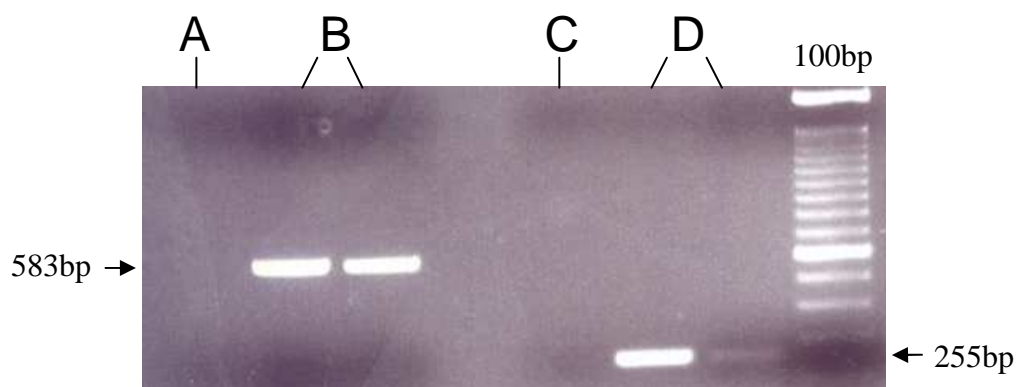


Figure 33: Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose du produit des PCR utilisant les oligonucléotides E1BamHI-2680-AS et E1*2126 A>T-S (B) et les oligonucléotides E1-1951-S et E1*2198C>A-AS. Le contrôle négatif de chaque PCR est montré dans la piste A et C.

II.2. Insertion des fragments mutés dans pcDNA 3.1 HisC-E1

Les fragments PCR contenant les mutations c.2126 T>A et c.2198 C>A ont été digérés par PshAI et BsrGI pour libérer des fragments de restriction de 561bp qui ont été utilisés pour remplacer le fragment homologue sauvage dans pcDNA 3.1 HisC-E1.8. Les colonies de bactéries transformées ont été analysées par PCR pour détecter celles contenant la mutation attendue. Ces PCR utilisaient des amorces spécifiques pour les mutations et ont été réalisées en conditions stringentes (température d'hybridation des amorces : 60°C). Les PCR ont montré une bande vers 600bp (données non montrées) pour 5 clones de pcDNA 3.1 HisC-E1*m-2126 et pour 1 clone de pcDNA 3.1 HisC-E1*m-2198. Le clone 3 de pcDNA 3.1 HisC-E1*m-2126 et le clone 10 de pcDNA 3.1 HisC-E1*m-2198 ont été sélectionnés pour être transfectés dans des cellules 293T après que leur intégrité ait été vérifiée par digestion avec KpnI et que la présence des mutations ait été vérifiée par séquençage.

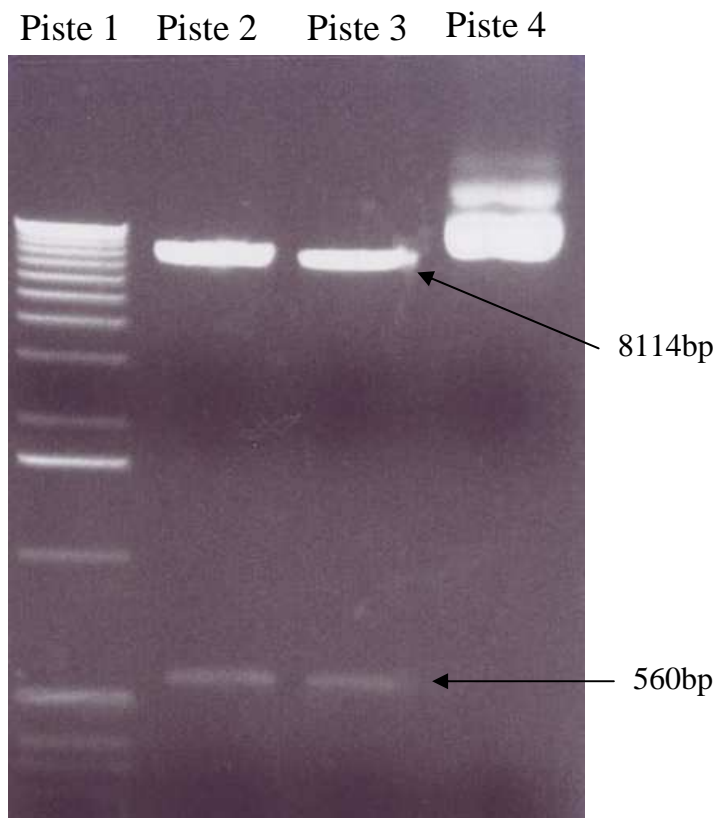
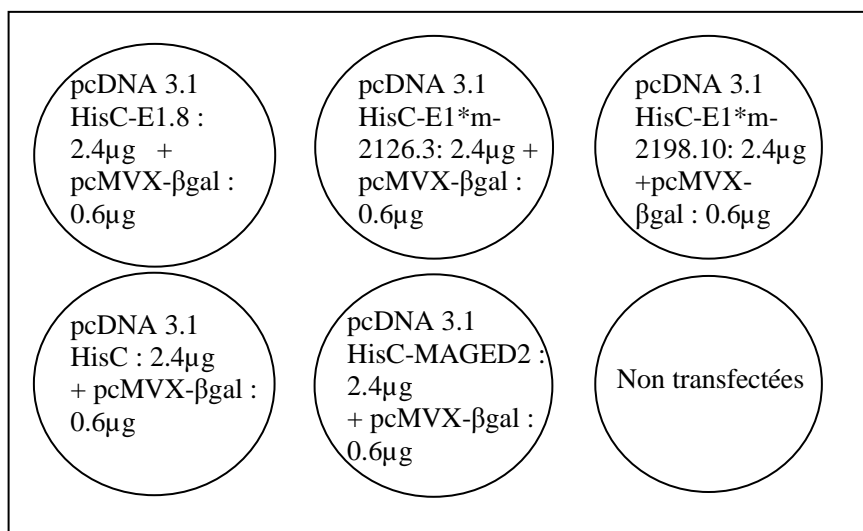


Figure 34 : Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose de de pcDNA 3.1 HisC-E1. 8 non clivé (piste 4) et du produit du clivage de pcDNA 3.1 HisC-E1. 8 par BsrGI et XbaI (piste 2 et 3). Le fragment de 8114bp a été déphosphorylé et ligué avec les fragments, homologues à celui de 560bp, obtenus par PCR et contenant les mutations. L'échelle de poids moléculaire utilisées est le « 1Kb DNA ladder » (Invitrogen) (piste 1).

III. Transfection de MAGEE1 dans des cellules 293T et analyse par WB

Afin de vérifier si nos trois constructions étaient capables de diriger l'expression de MAGEE1 dans des cellules, elles ont servi à transfecter des cellules humaines de rein embryonnaire (HEK 293T) dans une plaque 6-puits selon le plan suivant :



Vingt quatre heures après la transfection, les cellules ont été lysées et les protéines des lysats ont été analysées en Western Blot avec un anticorps anti-Xpress (figure 35). Nous avons observé une bande aux alentours de 90kDa dans le puits chargé avec le lysat des cellules 293T transfectées avec pcDNA 3.1 HisC-MAGED2 qui constituait notre contrôle positif. Nos contrôles négatifs que constituent les cellules 293T transfectées avec pcDNA 3.1 HisC et les cellules 293T non transfectées ne montrent aucune bande. Les lysats des cellules transfectées avec nos différentes constructions de *MAGEE1* (sauvage et mutant) montrent chacune une bande de 170kDa au lieu de la bande attendue à 103kDa.



Figure 35 : Western Blot des protéines des cellules 293T transfectées avec pcDNA 3.1 HisC-E1 (A), pcDNA 3.1 HisC-E1*m-2126 (B), pcDNA 3.1 HisC-E1*m-2198 (C), pcDNA 3.1 HisC (D), pcDNA 3.1 HisC-MAGED2 (E) et non transfectées (F).

IV. Transcription/traduction in vitro de MAGEE1

Au vu des résultats du point précédent, nous avons réalisé une expérience de transcription/traduction in vitro avec les plasmides pcDNA 3.1 HisC-E1.8, pcDNA 3.1 HisC-E1*m-2126.3, pcDNA 3.1 HisC-E1*m-2198.10, ainsi qu'avec les plasmides contrôle pT7-LUC et pcDNA 3.1 HisC-MAGED2 (figure 36). Nous espérons, par cette expérience, observer une bande à la taille attendue de MAGEE1 et qui nous aurait permis de nous diriger vers une explication de modifications post-traductionnelles potentielles pour la différence

entre le poids moléculaire théorique de MAGEE1 et celui observé par Western Blot. Les contrôles positifs que constituent le plasmide pT7-LUC et pcDNA 3.1 HisC-MAGEDE2 permettent de générer des produits de taille attendue, respectivement de 72kDa et 90kDa. Pour les plasmides pcDNA 3.1 HisC-E1, pcDNA 3.1 HisC-E1*m-2126 et pcDNA 3.1 HisC-E1*m-2198 une bande plus importante est observable vers 170kDa. Nous n'observons donc aucune différence de taille entre les protéines synthétisées *in vitro* et *in vivo*.

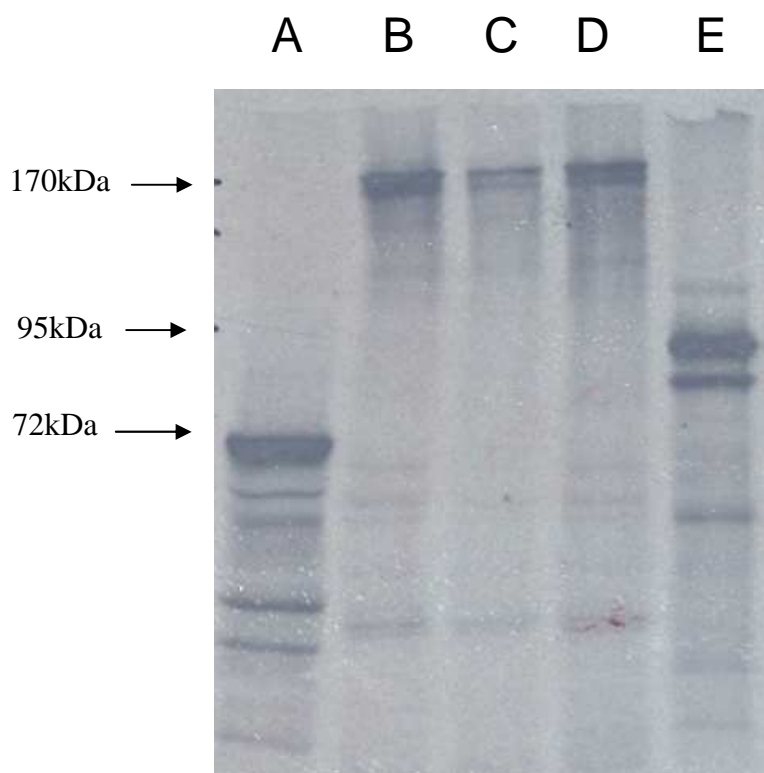


Figure 36: Transcription/traduction *in vitro* réalisée avec les plasmides pT7-LUC (A), pcDNA 3.1 HisC-E1 (B), pcDNA 3.1 HisC-E1*m-2126 (C), pcDNA 3.1 HisC-E1*m-2198 (D) et pcDNA 3.1 HisC-MAGED2 (E).

A partir de cette conclusion, nous avons suspecté une anomalie dans nos constructions plasmidiques. C'est pour cette raison, que nous avons réalisé une expérience de transcription/traduction *in vitro* avec le plasmide de départ, pcMV6-XL5-MAGEE1 (figure 37). Nous avons à nouveau observé une bande d'environ 170kDa par l'expérience de transcription/traduction avec le plasmide pcMV6-XL5-MAGEE1. Nous pouvons ainsi écarter une anomalie liée à nos manipulations puisque nous obtenons le même résultat qu'avec le plasmide de départ.

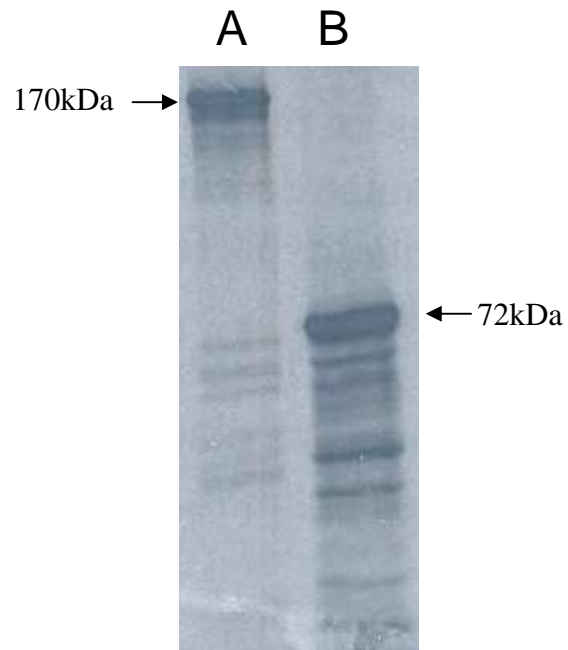


Figure 37 : Transcription/traduction in vitro réalisée avec les plasmides pcMV6-XL5-MAGEE1 (A) et de pT7-LUC (B).

Discussion et perspectives

Le premier gène *MAGE* fut découvert en 1991. Depuis, plusieurs dizaines de gènes *MAGE* ont pu être identifiés chez l'homme et la souris. Ceux-ci ont été classés en deux catégories suivant leur profil d'expression. La catégorie des gènes *MAGE* de type I comprend ceux des sous-familles *MAGEA*, *B* et *C*. Les gènes *MAGE* de type I sont exprimés dans une portion variable de tumeurs de divers types histologiques ainsi que dans les cellules de la lignée germinale mâle. Les gènes *MAGE* de type II sont ceux des sous-familles *MAGED*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L* et du gène *Necdin*. Ces gènes ont un profil d'expression très différent de celui des gènes de type I puisqu'ils sont exprimés dans de nombreux tissus somatiques normaux au cours du développement et chez l'adulte. Les gènes *MAGE* de type II les mieux caractérisés sont *Necdin*, qui est inhibiteur de croissance dans les cellules post-mitotiques et *MAGED1*, qui est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose.

Le gène de type II *MAGEE1* code pour une protéine dont la fonction est inconnue mais qui interagit physiquement avec la région N-terminale de l' α -dystrobrevine, une protéine du complexe de la dystrophine (Albrecht et al., 2003). Récemment, une analyse à haut débit de gènes mutés dans des tumeurs du sein a identifié 2 mutations provoquant chacune la substitution d'un acide aminé (p.Y640F et p.T664N) dans *MAGEE1* (Sjoblom et al., 2006). Ceci indique que *MAGEE1* et/ou ses formes mutées pourraient jouer un rôle dans le processus oncogène. C'est dans ce cadre que nous avons développé une approche permettant d'évaluer l'implication de *MAGEE1* sur la prolifération et la survie cellulaire. Comme nous ne disposons pas d'anticorps spécifique de *MAGEE1*, l'analyse de cette implication nécessitait la création d'une forme « étiquetée » de *MAGEE1* afin de pouvoir suivre l'expression de la protéine dans des cellules transfectées. Nous avons donc construit des vecteurs capables de diriger l'expression d'une version « étiquetée » (étiquette Xpress) de *MAGEE1* sous ses formes sauvage et mutées (p.Y640F et p.T664N) et nous les avons introduits dans des cellules 293T afin de vérifier qu'ils étaient fonctionnels. De manière inattendue, la bande détectée en Western correspondait à une protéine de 170kDa, soit une taille beaucoup plus grande que celle attendue (103kDa). Une telle situation a déjà été observée pour l' α -synucléine dont le poids moléculaire apparent en SDS-PAGE atteint 80kDa alors que son poids moléculaire théorique est de 14kDa. L'équipe de Moussa et al. (2004) a démontré que l'utilisation de gels de type Nu-PAGE (Invitrogen) permet d'observer la protéine α -synucléine à la taille attendue. Nous sommes donc occupés à réaliser une analyse de nos lysats avec des gels de type Nu-PAGE.

L'étape suivante du projet, si nous arrivons à prouver que la protéine exprimée dans nos cellules transfectées est bien *MAGEE1*, est de réaliser un « colony formation assay » et un « soft agar assay » afin d'évaluer si l'expression de *MAGEE1*, sauvage et sous ses formes mutées, modifie la prolifération des cellules. Nous allons également inspecter des tumeurs de divers types histologiques à la recherche de mutations dans le gène *MAGEE1*. Cette analyse nous permettra d'évaluer la fréquence des mutations de *MAGEE1* dans différents types de tumeurs et donc son importance potentielle dans le processus oncogène.

Bibliographie

1. Albrecht, D. E. & Froehner, S. C. DAMAGE, a novel alpha-dystrobrevin-associated MAGE protein in dystrophin complexes. *J Biol Chem* 279, 7014-23 (2004).
2. Andrieu, D. et al. Expression of the Prader-Willi gene Necdin during mouse nervous system development correlates with neuronal differentiation and p75NTR expression. *Gene Expr Patterns* 3, 761-5 (2003).
3. Bertrand, M., Huijbers, I., Chomez, P. & De Backer, O. Comparative expression analysis of the MAGED genes during embryogenesis and brain development. *Dev Dyn* 230, 325-34 (2004).
4. Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E. & Davies, K. E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 82, 291-329 (2002).
5. Brennan, P. A., Jing, J., Ethunandan, M. & Gorecki, D. Dystroglycan complex in cancer. *Eur J Surg Oncol* 30, 589-92 (2004).
6. Cheng, A. M. et al. Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell* 95, 793-803 (1998).
7. Chomez, P. et al. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* 61, 5544-51 (2001).
8. Clotman, F., De Backer, O., De Plaen, E., Boon, T. & Picard, J. Cell- and stage-specific expression of mage genes during mouse spermatogenesis. *Mamm Genome* 11, 696-9 (2000).
9. De Plaen, E., Naerhuyzen, B., De Smet, C., Szikora, J. P. & Boon, T. Alternative promoters of gene MAGE4a. *Genomics* 40, 305-13 (1997).

10. De Smet, C. et al. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7149-53 (1996).
11. Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Gaver, M. G. & Campbell, K. P. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345, 315-9 (1990).
12. Fletcher, G. C. et al. hAG-2 and hAG-3, human homologues of genes involved in differentiation, are associated with oestrogen receptor-positive breast tumours and interact with metastasis gene C4.4a and dystroglycan. *Br J Cancer* 88, 579-85 (2003).
13. Grisoni, K. et al. The stn-1 syntrophin gene of *C.elegans* is functionally related to dystrophin and dystrobrevin. *J Mol Biol* 332, 1037-46 (2003).
14. Henry, M. D. & Campbell, K. P. A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* 95, 859-70 (1998).
15. Henry, M. D. & Campbell, K. P. Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 8, 625-31 (1996).
16. Jordan, B. W. et al. Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death. *J Biol Chem* 276, 39985-9 (2001).
17. Laduron, S. et al. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Res* 32, 4340-50 (2004).
18. Lapidos, K. A., Kakkar, R. & McNally, E. M. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 94, 1023-31 (2004).
19. Lucas, S., Brasseur, F. & Boon, T. A new MAGE gene with ubiquitous expression does not code for known MAGE antigens recognized by T cells. *Cancer Res* 59, 4100-3 (1999).

20. MacDonald, H. R. & Wevrick, R. The necdin gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse. *Hum Mol Genet* 6, 1873-8 (1997).
21. Masuda, Y. et al. Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. *J Biol Chem* 276, 5331-8 (2001).
22. Matsuda, T. et al. The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with the melanoma-associated antigen (MAGE) family protein Dlxin-1 and regulates its intracellular distribution. *J Biol Chem* 278, 29057-64 (2003).
23. Moussa, C. E., Wersinger, C., Rusnak, M., Tomita, Y. & Sidhu, A. Abnormal migration of human wild-type alpha-synuclein upon gel electrophoresis. *Neurosci Lett* 371, 239-43 (2004).
24. Muscatelli, F. et al. Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* 9, 3101-10 (2000).
25. Muschler, J. et al. A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells. *Cancer Res* 62, 7102-9 (2002).
26. Nagao, T. et al. MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *J Biol Chem* 278, 10668-74 (2003).
27. Rees, M. L., Lien, C. F. & Gorecki, D. C. Dystrobrevins in muscle and non-muscle tissues. *Neuromuscul Disord* 17, 123-34 (2007).
28. Roberts, R. G. Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biol* 2, REVIEWS3006 (2001).
29. Roux, P. P. & Barker, P. A. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67, 203-33 (2002).

30. Sakurai, T. et al. A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells. *J Biol Chem* 279, 15505-14 (2004).
31. Salehi, A. H. et al. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* 27, 279-88 (2000).
32. Sasaki, A., Masuda, Y., Iwai, K., Ikeda, K. & Watanabe, K. A RING finger protein Praja1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1. *J Biol Chem* 277, 22541-6 (2002).
33. Sgambato, A. & Brancaccio, A. The dystroglycan complex: from biology to cancer. *J Cell Physiol* 205, 163-9 (2005).
34. Sjoblom, T. et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314, 268-74 (2006).
35. Sugita, S. et al. A stoichiometric complex of neuexins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol* 154, 435-45 (2001).
36. Taniura, H., Matsumoto, K. & Yoshikawa, K. Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin with p53. *J Biol Chem* 274, 16242-8 (1999).
37. Taniura, H., Taniguchi, N., Hara, M. & Yoshikawa, K. Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. *J Biol Chem* 273, 720-8 (1998).
38. Traversari, C. et al. Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics* 35, 145-52 (1992).

39. Uetsuki, T., Takagi, K., Sugiura, H. & Yoshikawa, K. Structure and expression of the mouse necdin gene. Identification of a postmitotic neuron-restrictive core promoter. *J Biol Chem* 271, 918-24 (1996).
40. Van den Eynde, B. et al. Presence on a human melanoma of multiple antigens recognized by autologous CTL. *Int J Cancer* 44, 634-40 (1989).
41. van der Bruggen, P. et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-7 (1991).
42. Weir, M. L. et al. Dystroglycan loss disrupts polarity and beta-casein induction in mammary epithelial cells by perturbing laminin anchoring. *J Cell Sci* 119, 4047-58 (2006).
43. Williams, M. E., Strickland, P., Watanabe, K. & Hinck, L. UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE. *J Biol Chem* 278, 17483-90 (2003).
44. Winder, S. J. The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci* 26, 118-24 (2001).
45. Yoshikawa, K. [Molecular mechanisms of differentiation and death of human neurons: with special reference to necdin and APP]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 20, 155-9 (2000).